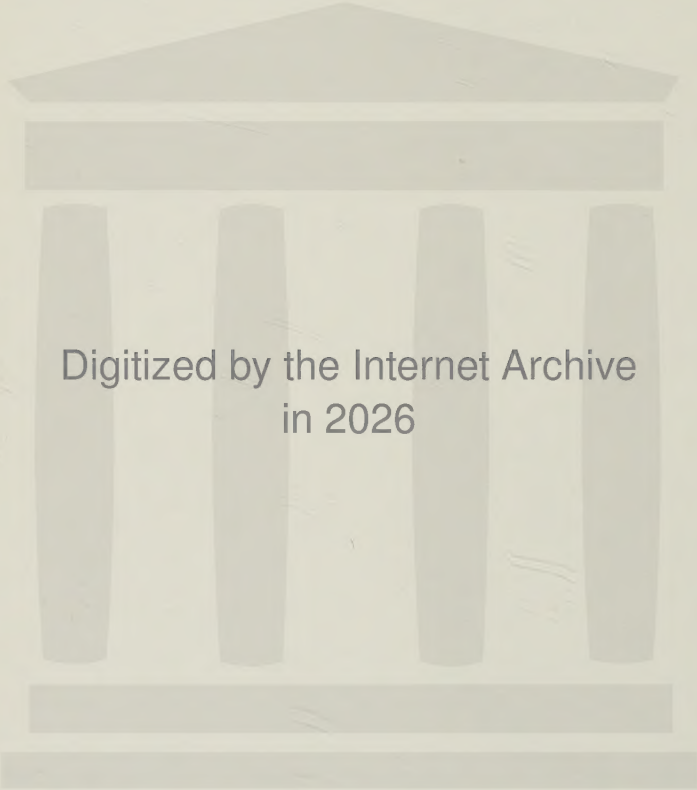


Wilhelm Koch

DER NACHWEIS INSEKTIZIDER
PHOSPHORSÄUREESTER MIT HILFE DER
CHOLINESTERASEHEMMUNG UNTER
VERWENDUNG EINER COLORIMETRISCHEN
METHODE ZUR BESTIMMUNG DER
ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT

Frankfurt am Main 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DER NACHWEIS INSEKTIZIDER PHOSPHORSÄUREESTER MIT
HILFE DER CHOLINESTERASEHEMMUNG UNTER VERWENDUNG
EINER COLORIMETRISCHEN METHODE ZUR
BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in
Frankfurt a. M.

vorgelegt
von
Wilhelm K o c h
Oestrich im Rheingau

1964



Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. W. F r a n z

1. Referent: Prof. Dr. Dr. W. D i e m a i r
 2. Referent: Prof. Dr. S. P f l e i d e r e r
- Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 1964
Tag der Promotion: 27. Juli 1964

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. ing. et Dr. phil. W. Diemair im Institut für Lebensmittelchemie der Johann-Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main durchgeführt.

Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. W. Diemair, an dieser Stelle für die wissenschaftliche Anleitung und die großzügige Förderung meiner Arbeit sehr herzlich zu danken.

Für die Durchführung der Arbeit wurden Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

Mir war Gelegenheit gegeben, mich in dem Biologischen Labor der Fa. Farbenfabriken Bayer A.G. in Leverkusen mit Fragen der Rückstandsanalytik zu befassen, wofür ich gleichfalls meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Allgemeine Einführung</u>	1
<u>I. Einleitung</u>	4
Chlorierte Kohlenwasserstoffe	4
Carbamate	5
Organische Phosphorverbindungen	5
Entstehung und Verhalten von Rückständen	7
Metabolismus, Toxizität und insektizide Wirkung	8
Bestimmungsmethoden	10
Chemische Methoden	12
Physikalisch-chemische Methoden	13
Chromatographische Methoden	13
Biotests	14
Enzymatische Methoden	16
Struktur und Wirkungsweise der Acetylcholinesterase	18
Die Hemmung der Cholinesterase durch Insektizide	20
Methoden zur Aktivitätsbestimmung	21
<u>II. Experimenteller Teil</u>	27
1. <u>Meßbedingungen</u>	28
Verlauf der Extinktionskurven	29
Beständigkeit der Farbintensität	31
Der Einfluß des Lichtes auf die Farbbeständigkeit	34
Ergebnisse	35

	Seite
2. <u>Bereitung der Enzym- und Substrat-</u> <u>lösung</u>	37
Enzymlösung	37
Substratlösung	38
3. <u>Bestimmung der optimalen Reaktions-</u> <u>bedingungen</u>	40
Enzym- und Substratkonzentration	40
Bestimmung des Einflusses von Reaktions- zeit und Reaktionstemperatur	44
4. <u>Die Darstellung von Standardhemmwert-</u> <u>kurven</u>	48
Dauer der Inkubationszeit	49
Bereitung der Wirkstofflösungen	50
Bestimmung der relativen Hemmwerte	52
Darstellung der Standardkurven	54
5. <u>Oxydation mit Brom</u>	
Bestimmung der Aktivitätsminderung durch Brom und Bromsuccinimid	59
Bestimmung der relativen Hemmwerte	61
Ergebnisse	61
6. <u>Die Anwendung der Nachweismethode zur</u> <u>Bestimmung von Rückständen</u>	63
Versuchsanordnung und Ergebnisse	63
Aufarbeitungsgang und Analysen- genauigkeit	66
7. <u>Papierchromatographische Versuche</u>	70
Herstellung eines Enzympräparates	71
Versuchsanordnung	71
Ergebnisse	72

	Seite
III. <u>Zusammenfassung</u>	75
Literaturverzeichnis	78
Anhang	88

Allgemeine Einführung

Unter den Gefahren, die dem Menschen durch die Natur drohen, steht mit an erster Stelle die Vernichtung der zum Lebenserhalt notwendigen Nahrungsmittel. Die hierfür in Frage kommenden Faktoren sind vielgestaltig, jedoch ist darunter neben den klimatischen Ursachen besonders die Vernichtung durch tierische und pflanzliche Lebewesen hervorzuheben. Zu diesen Schädlingen zählen einmal Viren, Bakterien, Pilze, Unkräuter, zum anderen Würmer, Schnecken, Insekten, Nagetiere.

Diese Gefahr wird erhöht durch die Vernichtung vieler natürlicher Feinde tierischer Schädlinge sowie durch die Anlage von Monokulturen, die besonders leicht befallen werden. Demgegenüber wird die Vernichtung von Lebensmitteln durch die infolge der wachsenden Weltbevölkerung erforderlich gewordene intensivere Bebauung der landwirtschaftlich nutzbaren Erdoberfläche und durch die umfangreichere Lagerhaltung immer mehr begünstigt.

Eine intensive Schädlingsbekämpfung setzte praktisch erst mit der Anwendung von chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln ein. Früher angewandte Methoden, wie das Einsammeln mit der Hand, das Anlegen von Leimringen, Bewässerungs- oder Dränagemaßnahmen zur Bekämpfung von Bodeninsekten, waren von geringerer Bedeutung.

Es ist heute praktisch unmöglich, auf die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln chemischer oder biologischer Art zu verzichten; es bleibt jedoch die Aufgabe bestehen, Vorsorge zum Schutze des Verbrauchers zu treffen, der mit seiner Nahrung eventuell Reste solcher Substanzen aufnimmt. Hierzu ist eine eingehende Kenntnis über die Entstehung und das Verhalten von Pflanzenschutzmittelrückständen, ihres analytischen Nachweises und ihrer toxikologischen Wirkung erforderlich. Die Versuche, solche Fragen zu beantworten, haben zur Schaffung eines neuen analytischen Fachgebietes, der Rückstandsanalytik, geführt, deren Aufgabenstellung teilweise weit über das Gebiet der reinen Analytik hinausreicht und die Bereiche von Botanik, Biochemie und Toxikologie berührt. Insbesondere besteht bei

der Lebensmittelkontrolle ein großes Interesse, analytische Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, Aussagen über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Pflanzenschutzmittelrückständen zu machen.

I. Einleitung

Die ersten Schädlingsbekämpfungsmittel waren in der Natur vorkommende Stoffe, wie Nicotin, Rotenon, ein Inhaltsstoff der Derriswurzel, und die in den Flores Pyrethri enthaltenen Pyrethrine. Gleichzeitig fanden anorganische Verbindungen, wie Arsenate, Kupfer-, Quecksilber- und Schwefelverbindungen, zur Schädlingsbekämpfung Eingang in die Landwirtschaft. Zu hohe Toxizität und eine zu geringe Wirkungsbreite bewirkten, daß früher benutzte Schädlingsbekämpfungsmittel heute nur mehr eine untergeordnete Rolle spielen. Von den anorganischen Verbindungen besitzen nur noch die Kupfer- und Schwefelverbindungen wegen ihrer Verwendungsmöglichkeit gegen Pilzerkrankungen eine größere Bedeutung.

An ihre Stelle traten die synthetischen, organischen Verbindungen, die mit den natürlichen Schädlingsbekämpfungsmitteln kaum noch identisch sind. Mit wenigen Ausnahmen lassen sie sich in folgende drei Gruppen einordnen:

Chlorierte Kohlenwasserstoffe

Carbamate

Organische Phosphorsäureester

Chlorierte Kohlenwasserstoffe

Die erste und gleichzeitig eine der bekanntesten Verbindungen aus der Klasse der chlorierten Kohlenwasserstoffe ist das Dichlordiphenyltrichloraethan (DDT), welches zu Beginn der vierziger Jahre von M ü l l e r aufgefunden wurde. Die in der Folgezeit entwickelten Vertreter dieser Gruppe sind Abkömmlinge des Cyclohexans (HCH), des Endomethylen-tetrahydroindens (Heptachlor, Chlordan), des Octahydrobis(endo)-methylen-naphthalins (Endrin, Dieldrin) und des Camphens (Toxaphen).

Carbamate

Die zur Schädlingsbekämpfung verwendeten Carbamate stellen größtenteils Ester der am Stickstoffatom mono- oder dialkylsubstituierten Carbaminsäure dar. Sie unterteilen sich in aromatische und heterocyclische Carbamate. Zu den ersteren zählt Sevin, in die zweite Gruppe gehören Dimeton, Pyrolan und Isolan. Ebenfalls zu den Carbamaten zählen die gegen parasitäre Pilzerkrankungen verwendeten Schwermetallsalze der N-substituierten Dithiocarbaminsäure, von denen Maneb und Zineb die bekanntesten sind.

Organische Phosphorverbindungen

Unter den synthetischen organischen Schädlingsbekämpfungsmitteln besitzen die organischen Phosphorverbindungen die größte Bedeutung. A r b u s o w berichtete 1906 über die Synthese einiger Phosphorsäureester, die heute als Acetylcholinesterasehemmstoffe erkannt sind (1). L a n g e und v. K r ü g e r stellten 1932 Dialkylfluorophosphate her und berichteten über deren physiologische Wirkung (2). Etwa ab 1934 erkannten S c h r a d e r und seine Mitarbeiter die insektizide Wirkung der Phosphorsäureester (3). 1937 gelang ihnen die Synthese von Amidocyanphosphorsäureestern, deren hohe Toxizität gegenüber Warmblütern und kontaktinsektizide Eigenschaft sie erkannten. Eine dieser Verbindungen, der N-Dimethylamidocyanphosphorsäureaethylester, wurde später unter dem Namen "Tabun" als Kampfgift benutzt. Im Anschluß daran entstanden 1938 das Tetraaethylpyrophosphat (TEPP), 1942 das Schradan, 1944 Parathion, Methylparathion sowie Paraoxon und danach in rascher Folge die bekanntesten Vertreter der insektiziden organischen Phosphorverbindungen, wie Malathion, Systox, Chlorthion, Diazinon, Gusathion, Metasystox, Delnav und andere (4). Sie stellen insgesamt Ester der Phosphorsäure, der Phosphonsäure, der Thiophosphorsäure, der Dithiophosphorsäure oder des Pyrophosphorsäureamids dar. S c h r a d e r entwickelte ein Schema für biologisch wirksame Phosphorverbindungen. Danach müssen diese ein fünfbindiges

Phosphoratom mit direkt gebundenem Schwefel aufweisen. Zwei Substituenten können Alkoxygruppen, Alkylgruppen oder Reste von Aminen sein, ein Acylrest kann in Form einer organischen oder anorganischen Säuregruppe, einem Enolrest oder Rest eines Mercaptans vorliegen (5).

Die Einteilung der Schädlingsbekämpfungsmittel erfolgt gewöhnlich nicht nach ihrer chemischen Konstitution, sondern - entsprechend ihrem Verwendungszweck - nach der Art der Schädlinge, gegen die sie eingesetzt werden. Danach unterscheidet man:

Fungizide	(Mittel gegen Pilze)
Acarizide	(Mittel gegen Milben)
Nematodizide	(Mittel gegen Würmer)
Molluscizide	(Mittel gegen Schnecken)
Insektizide	(Mittel gegen Insekten)
Rotendizide	(Mittel gegen Nagetiere)
Herbizide	(Mittel gegen Unkräuter)

Zusammenfassend werden sie in Anlehnung an die entsprechende angelsächsische Bezeichnung als Pestizide bezeichnet. Mit der Verwendung chemischer Schädlingsbekämpfungsmittel zeigten sich bald Nachteile, wie hohe Toxizität gegenüber Warmblütern, die Vernichtung nützlicher Insekten oder die Entstehung resistenter Insektenrassen. Mit Hilfe der biologischen Schädlingsbekämpfungsmittel, deren größte Bedeutung auf dem Gebiet der Vernichtung von Insekten durch insektenpathogene Keime liegt, können diese Nachteile teilweise ausgeschaltet werden. So wird der in die USA eingeschleppte Japankäfer (*Popillio japonica* Newm.) durch sporenbildende Bakterien bekämpft, die eine für andere Lebewesen ungefährliche, als "milky disease" bezeichnete Erkrankung hervorrufen (6).

Praktische Anwendung zu diesem Zweck hat auch der *Bacillus thuringiensis* Berliner gefunden (7). Trotz der Vorzüge der biologischen Schädlingsbekämpfung, wozu besonders das Fehlen toxischer Rückstände zu rechnen ist, steht die Schäd-

lingsbekämpfung mit chemischen Mitteln weit im Vordergrund.

Entstehung und Verhalten von Rückständen

Die Aufbringung der Pflanzenschutzmittel erfolgt durch Besprühen, Bespritzen, Bestäuben oder Begießen der zu schützenden Kulturen oder Einzelpflanzen. Da die meisten synthetischen organischen Insektizide wasserunlöslich sind, eine Ausnahme bildet Dipterex, werden sie zur Anwendung in sogenannte Formulierungsgemische übergeführt. Es ist daher stets zwischen Wirkstoff und Handelspräparat, welches mit dem Formulierungsgemisch identisch ist, zu unterscheiden, wobei der großen Anzahl der Handelspräparate eine bedeutend kleinere Anzahl an Wirkstoffen gegenübersteht.

Nach der Applikation bilden die Insektizide auf der Pflanze ein Depot, dessen Größe von der Art des Aufbringens, der Beschaffenheit der Pflanzenoberfläche und den Witterungsbedingungen abhängt. Das Depot wird zum Rückstand, wenn durch eine Reihe von unterschiedlichen Faktoren, wie klimatische Einflüsse, Oxydation durch den Luftsauerstoff, Eindringen in das Pflanzeninnere oder Umwandlung des Originalwirkstoffes durch den pflanzlichen Stoffwechsel eine Abnahme der aufgetragenen Insektizidmenge erfolgt (8).

Insektizide, welche die Fähigkeit besitzen, in die Cuticula oder in das darunter befindliche Gewebe einzudringen, werden als cuticuläre oder subcuticuläre Insektizide bezeichnet. Davon zu unterscheiden sind die systemischen Insektizide, welche in den Saftstrom der Pflanze eindringen und in diesem weitertransportiert werden. Zu den systemischen Insektiziden zählen Dipterex, Schradan, Systox, Phosdrin, Pyrolan und Isolan.

Durch laufende Probennahme vom Tage der Applikation an, läßt sich die Abnahme der Rückstände verfolgen. Bei graphischer Darstellung werden sogenannte Abbaukurven erhalten, deren Verlauf einer Reaktion erster Ordnung entspricht (8).

Bei halblogarithmischer Darstellung der relativen Rückstandswerte gegen die Zeit zeigen die Abbaukurven einen geradlinigen Verlauf. Zum Teil ist eine einfache oder doppelte Knickung zu beobachten, für die unterschiedliche, nacheinander wirksam werdende Abbaursachen verantwortlich gemacht werden (9). Zur Charakterisierung der Abbaugeschwindigkeit wurde der Begriff der RL-(residue life)-Zeit eingeführt, wobei beispielsweise RL_{50} - und RL_{90} -Werte angegeben werden (8).

Für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln wurden Wartezeiten festgelegt, die die Zeitspannen angeben, die zwischen der letzten Anwendung und der Ernte verstreichen müssen. In der Bundesrepublik werden Wartezeiten von der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig festgesetzt (10). In einigen Ländern dürfen eventuell auf der Handelsware vorhandene Rückstände eine bestimmte Grenze, die sogenannten Toleranzwerte nicht überschreiten, die entsprechend der Toxizität gegenüber Warmblütern festgelegt werden (11, 12).

Metabolismus, Toxizität und insektizide Wirkung

Wie die meisten Pharmaka unterliegen die Insektizide im tierischen und pflanzlichen Organismus Abwandlungsprozessen, die in der Endphase ihre Entgiftung und Ausscheidung zur Folge haben. Diese im einzelnen recht verschiedenartigen Prozesse lassen sich in vier Gruppen einordnen:

- Oxydationsreaktionen
- Hydrolisierungsvorgänge
- Reduktionsprozesse
- Dehydrochlorierungsreaktionen

Häufig ist bei der Metabolitbildung primär ein Ansteigen der Toxizität zu beobachten. Als Maß für die toxische Wirkung wird die Fähigkeit, den Cholinesterasekomplex zu blockieren, festgehalten (13, 14). Die Cholinesterase ist ein Bestandteil des nervösen Systems. Ihre Funktion besteht darin, das bei der

Reizleitung in dem Nerven gebildete Acetylcholin hydrolytisch zu spalten und den Nerven für eine neue Reizleitung bereit zu machen. Die teilweise oder völlige Blockierung der Cholinesterase hat somit eine Anreicherung von Acetylcholin im Organismus und damit einen Ausfall zum Teil lebenswichtiger nervöser Funktionen zur Folge.

Unter den Abbauprozessen stehen die Oxydationsreaktionen an erster Stelle. Bei Estern der Thiophosphorsäure erfolgt eine Oxydation des Thionoschwefels, die vermutlich über Sulfoxyd und Sulfon zur Oxonform führt (15, 16). Bei Warmblütern erfolgt dieser Vorgang in der Leber (17, 18). G a g e (17) konnte nach Applikation von Parathion bei Ratten 0,1 % der injizierten Menge als Paraoxon aus der Leber isolieren. Parallel zur Oxydation nimmt die Hemmwirkung gegenüber Cholinesterase zu. D i g g l e und G a g e (19) zeigten, daß die in vitro-Hemmung von Parathion fast ausschließlich auf das in technischen Produkten mit vorliegende S-Aethylisomere zurückzuführen ist und bei der Thionoform nach der Oxydation zu Paraoxon ein beträchtliches Ansteigen der Hemmwirkung zu beobachten ist. Bei Estern der Thio- oder Dithiophosphorsäure, die in der alkoholischen Komponente eine alkylierte Mercaptogruppe aufweisen, wie Thimet, Metasystox oder Thiometon, erfolgt in der Pflanze bevorzugt die Oxydation des Mercaptoschwefels vor der des Thionoschwefels, wodurch eine Vielzahl von Metaboliten entsteht (20, 21). Der weitere Abbau scheint in einer hydrolytischen Spaltung zu bestehen. Spaltprodukte konnten, zum Teil als Aether der Glukuronsäure, in Urin und Faeces nachgewiesen werden (22, 23). Sie erfolgt bei Warmblütern im Anschluß an die Oxydation hauptsächlich in der Leber (18, 24). Daneben konnte C o o k (25) die Spaltung von Parathion und die Reduzierung des dabei entstehenden p-Nitrophenols zu p-Aminophenol durch das Sekret des Rinderpansens nachweisen.

Der erste Schritt bei dem physiologischen Abbau von Schradan, einem Insektizid vom Typ der N-alkylierten Phosphorsäureamide, besteht in einer Sauerstoffanlagerung an den Stickstoff (26, 27). C a s i d a und S t a h m a n n (28) schreiben diesen Oxydationsvorgang der Wirkung eines als Phosphoramidoxydase bezeichneten Enzyms zu. Durch Umlagerung entsteht eine Verbindung, die

als N-Methylolform bezeichnet wird und die aktive Form des Schradans darstellt (29).

Die toxische Wirkung von Dipterex wird darauf zurückgeführt, daß es durch Dehydrochlorierung in eine mit DDVP identische Verbindung umgewandelt wird (30, 31). Dehydrochloriertes Dipterex sowie DDVP werden ihrerseits in der Leber in Dimethylphosphat und Dichlorvinylalkohol gespalten und im Harn ausgeschieden. Eine Dehydrochlorierung wurde auch bei DDT beobachtet und einem Ferment, welches in DDT-resistenten Fliegen nachgewiesen wurde, zugeschrieben (32).

Daß eine Blockierung von Cholinesterase auch durch Carbamate erfolgt, wurde von Kolbezen, Metcalf und Fukuto (33) gezeigt. Die größte Wirksamkeit sowohl gegenüber der Cholinesterase als auch als Kontaktinsektizide weisen N-Phenylcarbamate auf, bei denen der Phenylring in meta-Stellung substituiert ist.

Worin die toxische Wirkung von Pflanzenschutzmitteln bei Insekten zu suchen ist, ist nicht vollständig geklärt. Bei Hausfliegen, Bienen und einigen anderen Insekten wurde ein Cholinesterasesystem nachgewiesen, welches dem der Warmblüter gleicht (34). O'Brien (35) vertritt, hauptsächlich wegen der Analogie zu den Verhältnissen bei Säugern, die Meinung, daß die toxische Wirkung in erster Linie auf der Blockierung dieses Systems beruht, weist jedoch gleichzeitig darauf hin, daß Heuschrecken trotz völliger Inaktivierung der Cholinesterase weiterleben können und daß andererseits bei Todeseintritt nicht die gesamte Enzymmenge inaktiviert zu sein braucht.

Bestimmungsmethoden

Die Größenordnung, in der Rückstände gewöhnlich in Erntegut oder in Nahrungsmitteln auftreten, liegt im ppm-Bereich, wodurch zu ihrem analytischen Nachweis besondere Aufarbeitungs- (Cleanup)-Verfahren erforderlich sind. Einen Überblick über die hierzu angewandten Methoden geben Gunther und

B l i n n (36) sowie S c h e c h t e r und H o r n -
s t e i n (37). Die bei dem Herauslösen des Wirkstoffes aus
dem Trägermaterial mitextrahierten Pflanzenstoffe können durch
eine Reihe verschiedenartiger physikalisch-chemischer Methoden
entfernt werden. Bei Insektiziden, die sich unzersetzt destil-
lieren lassen, wie einige chlorierte Kohlenwasserstoffe, kann
eine Trennung durch die Wasserdampfdestillation erfolgen (38).
Weitgehende Verwendung findet die partielle Verteilung der
Substanzen zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln zur
Trennung von Wirk- und Pflanzeninhaltsstoffen. Die säulen-
chromatographische Reinigung macht sich die unterschiedliche
Haftfähigkeit von Wirkstoff und pflanzlichem Begleitmaterial
an inertem Trägermaterial zunutze (39, 40). Pflanzenbegleit-
stoffe, die weitgehend aus Fetten bestehen, können durch Aus-
frieren aus einer organischen Lösung von den Wirkstoffen ge-
trennt werden. Die Verwendung von Ionenaustauschern wurde bei
einer Bestimmung von Gesamtarsen beschrieben (41). Eine weite-
re Möglichkeit zur Entfernung unerwünschter Pflanzenbegleit-
stoffe besteht darin, sie chemisch abzubauen. Dies kann durch
Oxydation (42), Verseifung mit Pankreaslipasen bei überwiegend
fettigen Begleitstoffen (43) oder bei Eiweißstoffen durch
Hydrolyse mit Papain erfolgen.

Daneben wurde versucht, durch chemische Veränderung der Wirk-
stoffe eine Isolierung aus dem Gesamtextrakt zu ermöglichen,
wie bei der Methode von A v e r e l l und N o r r i s
(44). Hierbei werden schwer wasserlösliche Verbindungen vom
Nitrobenzoltyp (Parathion) durch Reduktion in Aminobenzol-
verbindungen, die in saurem Milieu wasserlöslich sind, über-
führt.

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Pestiziden
wurden nahezu alle modernen Verfahren der analytischen Chemie
sowie biologische und enzymatische Methoden herangezogen. Sie
lassen sich etwa folgendermaßen einteilen:

Chemische Methoden

Physikalisch-chemische Methoden

Chromatographische Verfahren

Biotests

Enzymatische Methoden

Chemische Methoden

Bei den chemischen Methoden ist zwischen Einzelmethode und gruppenspezifischen Bestimmungsverfahren zu unterscheiden. Zusammenstellungen von Einzelmethode wurden verschiedentlich veröffentlicht (37, 45), sie werden wegen ihrer Vielzahl nicht einzeln erörtert. Unter den gruppenspezifischen Verfahren steht die Bestimmung des Gesamtchlors und des Gesamtphosphors im Vordergrund. Zur Gesamtphosphorbestimmung wird der weitgehend gereinigte Wirkstoff mit Salpetersäure, Perchlorsäure und Schwefelsäure naß verascht, wonach der Phosphor als Phosphat vorliegt. Dieses wird mit Ammonmolybdat und Natriumsulfid in Phosphormolybdänblau übergeführt und colorimetrisch bestimmt (46). M a i e r - B o d e (47) beschreibt eine Methode zur Bestimmung von Thiophosphorsäureestern. Hierbei wird der Schwefel als Schwefelwasserstoff abgespalten und nach Überführung in Methylenblau colorimetrisch bestimmt.

Eine dem Gesamtphosphorverfahren ähnliche Methode wurde von F r e h s e und T i e t z (48) zum Nachweis von Arsen benutzt. Zur Gesamtchlorbestimmung wird das organisch gebundene Chlor in Chlorid übergeführt. A g a z z i , P e t e r s und B r o o k s (49) führen eine Verbrennung im Luftstrom durch, der entstehende Chlorwasserstoff wird in Sodalösung absorbiert und das Chlorid unter Verwendung von Silbernitratlösung amperometrisch bestimmt. Eine andere Methode, organisch gebundenes Chlor in Chlorid zu überführen, stellt die Reduktion mit Natrium dar, wozu Lösungen in wasserfreiem Ammoniak (50) oder in organischen Lösungsmitteln (51, 52) verwendet werden.

Physikalisch-chemische Methoden

Vielfache Anwendung findet die Infrarotspektalanalyse (53, 54, 55, 56). Z w e i g und Mitarbeiter (57) verwenden die Infrarotspektrographie zur Auswertung gaschromatographisch isolierter Wirkstoffe. Die teilweise geringe Empfindlichkeit und die

Überlagerung charakteristischer Banden des Wirkstoffes durch solche der Begleitstoffe engen die Anwendungsmöglichkeiten der infrarotspektrographischen Bestimmung ein.

Chromatographische Methoden

Die Möglichkeit, Pflanzenschutzmittel qualitativ mit Hilfe der Papierchromatographie nachzuweisen, wurde in zahlreichen Veröffentlichungen (58, 59, 60, 61, 62, 65, 66) beschrieben. Zum Nachweis solcher Verbindungen in Pflanzenmaterial ist eine vorhergehende Reinigung des Extraktionsmaterials unbedingt erforderlich, da mitgeführte Pflanzenstoffe die R_f -Werte der Reinsubstanzen erheblich verändern. Spezielle Cleanup-Methoden wurden für diesen Zweck beschrieben (63, 64). Die Entwicklung erfolgt am zweckmäßigsten mit zweiphasigen Trennsystemen, wie beispielsweise Silikonöl und Alkohol-Aceton-Wasser (65) oder Mineralöl und wäßrige Dimethylformamidlösung (60). Die Sichtbarmachung chlorierter organischer Insektizide kann nach einem von Mitchell (60) beschriebenen Verfahren erfolgen, wobei das organisch gebundene Chlor in Chlorid übergeführt und dieses mit Silbernitratlösung sichtbar gemacht wird. Für Ester der Phosphorsäure verwenden Fischer und Klingelehner (61) Natriumazidreagens. Hanos und Isherwood (62) führen eine Hydrolyse der Phosphorsäureester durch und weisen die Phosphorsäure mit der Molybdänblaureaktion nach. Cook (58) benutzt Fluorescein und N-Bromsuccinimid zum Nachweis von Verbindungen der Thiophosphorsäure. Weltzien (66) führt zur Identifizierung von Fungiziden eine Bebrütung der Chromatogrammbögen mit einem Testpilz durch. Die Anwendung der Cholinesterasehemmung zur Lokalisierung von Phosphorsäureestern und Carbamaten wird noch behandelt. Über die quantitative Auswertung durch Messung der Lichtabsorption der Substanzflecke berichten Zweig und Archer (67).

Verschiedentlich wurde auch die Dünnschichtchromatographie zum qualitativen Nachweis herangezogen (68, 61, 69, 70).

P e t r o w i t z (69) verwendet zur Trennung von chlorierten Kohlenwasserstoffen Cyclohexan, Petrolaether, Chloroform und ein Gemisch von Benzol und Methanol im Verhältnis 19 : 1. Die Anfärbung erfolgt mit Monoäthylamin und Silbernitratlösung. K o v a c s jr. (70) zeigte, daß unter UV-Licht chlorierte Kohlenwasserstoffe auf Dünnschichtchromatogrammen sichtbar werden, die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa einem ppm.

Die Gaschromatographie findet hauptsächlich zur Bestimmung chlorierter Kohlenwasserstoffe Anwendung (58, 71, 72, 73, 74). Ihre Anwendung in der Rückstandsanalytik geht in erster Linie auf C o u l s o n , C a v a m a g h und S t u a r t (73) zurück, die neben chlorierten Kohlenwasserstoffen Systox, Parathion und Malathion nachweisen konnten. M c K i n l e y (74) fand in Modellversuchen bei Methylparathion, Ethion, Diazinon und Trithion zwischen 52 und 68 % der eingesetzten Substanzmengen wieder, für Parathion betrug die Ausbeute 84 %.

Biotests

Als unspezifische Methoden zum Nachweis von Pestiziden können Biotests da angewandt werden, wo chemische Methoden mit genügender Empfindlichkeit fehlen. Hauptnachteile des Biotests sind die Schwierigkeit, geeignetes Testmaterial aufzuziehen und vorrätig zu halten sowie die zu geringe spezifische Wirkung. D e w e y (75) verlangt von einem Testorganismus eine Empfindlichkeit von 0,1 - 1,0 ppm, eine möglichst niedrige natürliche Sterberate und eine geringe Mortalität durch pflanzliche Begleitstoffe. Als Testorganismen wurden in erster Linie Hausfliegen (*Musa domestica*) (76), Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) (77), Daphnien (*Daphnia magna* Strauß und *Daphnia pulex*) (78, 79), Moskitolarven (*Aedes aegyptii*) (80) und Guppies (*Lebistes reticulatus*) (81) verwendet.

Von den angegebenen Insektenarten sind Hausfliegen am leichtesten zu züchten. Sie besitzen den Vorzug, gegenüber Pflanzen-

extraktstoffen und nichtinsektiziden Pflanzenschutzmitteln wenig empfindlich zu sein. Moskitolarven sind schwieriger zu züchten und zu handhaben. Sie sind äußerst empfindlich gegenüber Insektiziden, jedoch auch gegenüber natürlichen Bestandteilen aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe. Etwa die gleiche Empfindlichkeit zeigen Taufliegen, bereiten jedoch weniger Schwierigkeiten bei der Aufzucht und der Haltung. W a s s e r b u r g e r (78) stellte bei *Daphnia magna* eine höhere Empfindlichkeit als bei Haus- und Taufliegen fest. An Hand der durch die Vergiftung ausgelösten Bewegungen glaubt er qualitative Aussagen machen zu können. P a f f (79) stellte noch charakteristischere Unterschiede für die Vergiftungserscheinungen bei sechzehn verschiedenen Phosphorsäureestern fest. Nach P a g a n und H a g e m a n (81) eignen sich Guppies besonders gut zum Nachweis chlorierter Kohlenwasserstoffe, von denen DDT noch in einer Konzentration von 0,025 ppm innerhalb von vierundzwanzig Stunden eine Mortalität von fünfzehn Prozent bewirkt. Der Versuch, den Biotest zu qualitativen Aussagen zu verwenden, wurde von H a r w o o d und A r e e k u l (82) unternommen. Sie applizierten die LD₅₀-Dosis für einen bestimmten Organismus drei weiteren Tierarten und erhielten dabei charakteristische Mortalitätsraten. S u n (77) gibt einen Überblick über die Methodik des Biotests. Danach kann die Applikation von Wirkstoffen in Form sogenannter Trockenfilme, in wäßriger Lösung oder mit der Nahrung erfolgen. Trockenfilme werden durch Verdampfen des Lösungsmittels aus einem in dünner Schicht auf eine glatte Unterlage aufgetragenen ätherischen Auszug des Untersuchungsmaterials erhalten. Die Trockenfilmmethode eignet sich besonders für den *Drosophilatest* (83). Ähnlich wird bei der Fütterungsmethode vorgegangen. Der Ätherextrakt wird auf Zucker aufgetragen und dieser nach dem Verdampfen des Äthers in Wasser gelöst und dem Testtier als Futter dargeboten. Die Applikation in wäßriger Lösung, die bei wasserbewohnenden Testorganismen Anwendung findet, bietet den Vorzug, daß der Wirkstoff auf die gesamte Oberfläche des Testtieres einwirkt.

Enzymatische Methoden

Enzymatische Nachweisverfahren beruhen auf der Eigenschaft von einer Reihe von Insektiziden, die Aktivität von Enzymen herabzusetzen oder völlig auszuschalten. Läßt man auf definierte Enzymmengen verschieden große Wirkstoffmengen einwirken, kann die zu beobachtende Aktivitätsminderung zur Aktivität einer gleich großen, ungehemmten Enzymmenge in ein Verhältnis gesetzt werden. Die so erhaltenen relativen Hemmwerte ergeben bei graphischer Darstellung gegen die zugehörige Wirkstoffkonzentration Hemmkurven mit S-förmigem Verlauf.

Zur enzymatischen Insektizidbestimmung wird nahezu ausschließlich Cholinesterase verwendet. Eine Ausnahme stellt die Methode von Keller (84) dar, der die Inhibitorwirkung von DDT auf Carbonanhydrase zum quantitativen Nachweis heranzieht.

Die hauptsächlich benutzte Cholinesterase zählt zur Gruppe der Azolesterasen. Ihre physiologische Aufgabe besteht darin, das bei der Reizleitung im Nerven an den Endplatten auftretende Acetylcholin abzubauen. Acetylcholin bewirkt eine Depolarisierung der Endplatte, wodurch diese für neu ankommende Impulse unerregbar wird (85). Es wurde erstmals von Loewi (86) bei Reizversuchen am isolierten Froschherzen beobachtet und von ihm zunächst als Vagusstoff bezeichnet. Kurze Zeit später beschrieben Loewi und Navratil (87) ein Ferment, welches in der Lage ist, Acetylcholin aufzuspalten, und durch Eserin gehemmt wird. Steedman, Steedman und Easson (88) fanden im Serum von Pferdeblut ein Enzym, welches Acetyl- und im größeren Umfang Butyrylcholin spaltet. Sie erkannten den Unterschied des von ihnen als Cholinesterase bezeichneten Fermentes zu den in Schweine- und Katzenlebern enthaltenen Esterasen, die Cholinester kaum aufspalten. Ammon (89) konnte nachweisen, daß die hydrolytische Aktivität dieses Cholinesterasekomplexes durch Physostigmin, Prostigmin und Ergotamin sowie weniger stark durch Suprarenin, Strychnin, Atropin, Chinin und Pilocarpin beeinträchtigt wird.

Es zeigte sich, daß die Cholinesterase kein einheitliches Enzym, sondern einen Enzymkomplex darstellt, dessen einzelne Bestandteile durch ihre unterschiedliche hydrolytische Aktivität gegenüber bestimmten Substraten charakterisiert werden können. Nachmansohn und Rothenburg (90) wiesen darauf hin, daß Serumesterase Butyrylcholin zweibis dreimal rascher spaltet als das in den Erythrozyten enthaltene Enzym. Alles und Hawes (91) sowie Mendel und Rudney (92) konnten zeigen, daß die Hydrolyse von Acetylcholin durch Erythrozytenesterase bei Substratüberschuß gehemmt wird, während sie bei Serumesterase mit steigender Substratkonzentration zunimmt. Benzoylcholin, welches als spezifisches Substrat für Serumesterase angesehen wurde, wird auch von Nichtcholinesterase, wie sie im Pansen von Wiederkäuern gefunden wird, gespalten (93). Augustinsson und Nachmansohn (94) schlugen für die Erythrozytenesterase den Namen Azetylcholinesterase vor.

Zur Unterteilung des Cholinesterasekomplexes werden die Unterschiede in der Substratspezifität herangezogen (95, 96). In Gruppe I sind jene Esterasen zusammengefaßt, welche eine spezifische hydrolytische Wirkung gegenüber Acetylcholin zeigen und das d-Isomere des Acetyl- β -Methylcholins spalten. Ein Überschuß von Acetylcholin hemmt die Reaktion. Sie werden als Acetylcholinesterasen (AChE) bezeichnet. Die übrigen Cholinesterasen werden in Gruppe II zusammengefaßt. Sie werden als unspezifische Cholinesterasen, Pseudocholinesterasen oder Butyrylcholinesterasen bezeichnet. Acetylcholinüberschuß bewirkt keine Hemmung der hydrolytischen Aktivität. Gegenüber Butyrylcholin und Benzoylcholin besteht eine spezifische hydrolytische Wirkung. d-Acetyl- β -Methylcholin wird von den Esterasen der Gruppe II nicht gespalten.

Zur Abgrenzung der Cholinesterasen gegen die Nichtcholinesterasen wird die Eserinempfindlichkeit herangezogen (96). Esterasen, welche durch eine 10^{-5} molare Eserinkonzentration nicht gehemmt werden, werden nicht zu den Cholinesterasen gerechnet. Wesentlich ist jedoch, daß Cholinesterasen nicht

nur Ester des Cholins zu hydrolysieren vermögen.

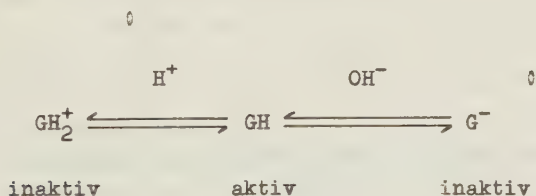
Cholinesterasen der Gruppe I werden vor allem in den Erythrozyten gefunden. Sie sind ferner im Nervengewebe sowie in größerer Menge im elektrischen Organ des Zitteraals enthalten. Die Esterasen der Gruppe II finden sich vorwiegend im Blutserum.

Struktur und Wirkungsweise der Acetylcholinesterase

In einer Zusammenfassung gibt Wilson (97) einen Überblick über die gegenwärtige Vorstellung von Struktur und Wirkungsmechanismus der Acetylcholinesterase. Die reinsten Präparate, die aus dem elektrischen Organ des Zitteraals hergestellt wurden, zeigen ein Molekulargewicht von 2×10^6 bis 12×10^6 . Da das Enzym sein Aktivitätsmaximum bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen erreicht, lag der Schluß nahe, daß nur ein kleiner Teil des Eiweißkomplexes, der als aktives Zentrum bezeichnet wird, auf das Substrat einwirkt. Dieses Zentrum besteht aus zwei Teilen, einem anionigen und einem esteratischen Bereich. Der esteratische Bereich wird seinerseits aus einer basischen und einer sauren Gruppe gebildet.

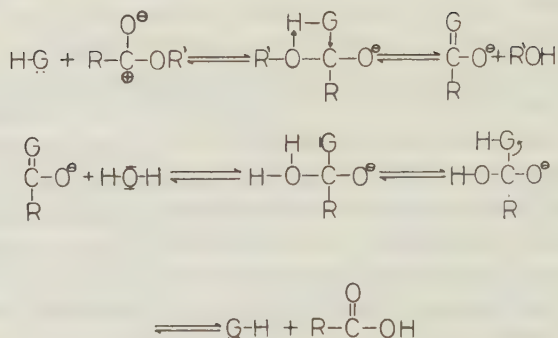
Die Bindung des Substratmoleküls an das Protein wird drei Faktoren zugeschrieben: Coulomb'schen Kräften zwischen dem anionigen Zentrum und dem positiv geladenen Teil des Substrates, van der Waal'schen Kräften, die auf die Methylengruppen des Substratmoleküles und ungeladene Stellen des Enzyms einwirken und einer kovalenten Bindung, die sich zwischen der elektrophilen Carbonylgruppe des Substratmoleküles und der basischen Gruppe des esteratischen Bereiches ausbildet. Die Existenz coulomb'scher Bindekräfte wird hauptsächlich mit dem unterschiedlichen Einfluß der pH-Änderung auf die Inhibitorwirkung von Neostigmin und Physostigmin begründet. Neostigmin, dessen Struktur von pH-Änderungen unbeeinflusst bleibt, zeigt im pH-Bereich von 6,0 bis 10,0 prak-

tisch keine Änderung der Inhibitorwirkung. Bei Physostigmin läßt diese Wirkung oberhalb $\text{pH}=8,0$, wo das Alkaloid ungeladen vorliegt, stark nach. Die Existenz van der Waal'scher Kräfte wird unter anderem damit begründet, daß sich bei Inhibitoren mit methylsubstituiertem Stickstoff ein Absinken der Inhibitorwirkung bemerkbar macht, sobald weniger als drei Methylgruppen vorhanden sind. Die Ausbildung der kovalenten Bindung wird mit der Struktur des esteratischen Zentrums begründet. Bei Inhibitorversuchen mit TEPP (Tetraaethylpyrophosphat), einer Verbindung, die keine kationige Ladung trägt und somit nicht mit dem anionen Bereich verbunden sein kann, ist die Inhibitorwirkung bei $\text{pH} = 8,0$ am größten, was, da die Struktur von TEPP nicht durch pH -Änderungen beeinflusst wird, einer Veränderung im esteratischen Bereich zugeschrieben wird. Wilson und Bergmann (98) erklären diese Erscheinung mit der Existenz einer basischen und einer sauren Gruppe. Schematisch wird die Funktion des esteratischen Bereiches wie folgt wiedergegeben:



Nach Wilson verläuft die Hydrolyse der als Substrate dienenden Cholinester so, daß zunächst zwischen dem esteratischen Bereich und dem elektrophilen Kohlenstoffatom des Esterkarbonyls eine kovalente Bindung entsteht. Durch Abspaltung der alkoholischen Esterkomponente unter Beteiligung eines Protons aus dem esteratischen Bereich entsteht das acylierte Enzym. Als zweiter Schritt erfolgt die hydrolytische Aufspaltung des acylierten Enzymes. Sie stellt schematisch die Umkehrung der ersten Reaktion dar.

Den Gesamtvorgang gibt W i l s o n mit folgender Reaktionsgleichung wieder:



Die Hemmung der Cholinesterase durch Insektizide

Wann erstmals die Inhibitorwirkung von Insektiziden gegenüber der Cholinesterase beobachtet wurde, ist nicht eindeutig festzustellen. A u g u s t i n s s o n (99) nimmt an, daß die Wirkung organischer Phosphorsäureester auf das Cholinesterasesystem zugleich mit ihrer Synthese und der Erforschung ihrer biologischen Wirkung erkannt wurde. A d r i a n, F e l d b e r g und K i l b y (100) fanden bei pharmakologischen Untersuchungen mit Diisopropylphosphat (DIP) eine eserininähnliche Wirkung. M a c k w o r t h und W e b b (101) konnten zeigen, daß bei Eserin eine reversible Hemmung vorliegt, die zum Beispiel durch Dialyse zu beseitigen ist, während die Hemmung durch DIP irreversibel ist. Die Erhöhung

der Inhibitorwirkung von Thiophosphorsäureestern und Phosphorsäureamidverbindungen durch Abwandlung der genuinen Substanzen im tierischen Organismus wurde erstmalig von Gardiner und Kilby (102) beobachtet.

Als Angriffspunkt der organischen Phosphorsäureester wird das aktive Zentrum des Enzyms angenommen (97, 103). Die Blockierung ist als eine Phosphorylierung analog der Acylierung bei der Substrathydrolyse aufzufassen. Nach Wilson (97) besitzen Phosphorsäureester ein elektrophiles Phosphoratom, das bei der Phosphorylierung die gleiche Rolle spielt wie der Carbonylkohlenstoff bei der Substrathydrolyse. Die Dephosphorylierung kann durch Wasser erfolgen, jedoch verläuft dieser Prozeß äußerst langsam. Bei O,O Dimethylverbindungen sind dazu einige Stunden erforderlich, bei O,O Diisopropylverbindungen der Phosphorsäure ist praktisch keine Hydrolyse mehr zu beobachten. Eine Dephosphorylierung ist jedoch in keinem Falle völlig ausgeschlossen, so daß von einer irreversiblen Hemmung in absoluter Form nicht gesprochen werden kann. Es zeigte sich zudem, daß Substanzen mit stärker nukleophilem Charakter als Wasser eine schnellere Reaktivierung bewirken. Wilson fand, daß Hydroxylamin und Cholin hierzu besonders geeignet sind. Noch besser eignet sich das N-Methyl-Pyridin-2-aldoxim (PAM), mit dem durch TEPP blockierte Cholinesterase innerhalb einer Minute zu 80 % reaktiviert werden konnte (104).

Methoden zur Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung der Cholinesterase erfolgt über den Nachweis von Substratveränderungen. Bei der Verwendung von Acetylcholin kann die gebildete Essigsäure oder der Substratrest bestimmt werden. Daneben besteht die Möglichkeit, Substratverbindungen zu benutzen, deren Spaltprodukte direkt oder nach Überführung in Farbverbindungen optisch nachgewie-

sen werden können. Auf dieser Basis wurde eine große Anzahl von Bestimmungsmethoden entwickelt (105), von denen nur diejenigen erwähnt werden sollen, die beim Nachweis von Insektiziden Anwendung gefunden haben.

Im Vordergrund steht die manometrische Bestimmungsmethode, die von A m m o n (89) zuerst benutzt wurde. Als Reaktionsmedium dient eine Bicarbonat-Ringerlösung mit einem pH-Wert von 7,3 bis 7,4. Die im Verlauf der Hydrolyse entstehende Essigsäure setzt daraus Kohlendioxyd frei, das mit der von W a r b u r g entwickelten Apparatur quantitativ bestimmt wird. A m m o n benutzte diese Versuchsanordnung unter anderem zur Standardisierung acetylcholinspaltender Enzyme. Er setzte als eine internationale Einheit diejenige Enzymmenge fest, die unter den von ihm angegebenen Bedingungen pro Minute 1 mm³ Kohlendioxyd freisetzt. Bei der quantitativen Analyse von Insektiziden wirken zunächst für eine bestimmte Zeitspanne (Inkubationszeit) bekannte Inhibitorkonzentrationen auf definierte Enzymmengen ein. Nach Zugabe des Substrates werden die in einer weiteren definierten Zeitspanne (Hydrolysenzeit) gebildeten Kohlendioxydmenngen bestimmt und zu der eines in gleicher Weise behandelten wirkstofffreien Ansatzes in Beziehung gesetzt. Mit den so erhaltenen relativen Hemmwerten werden Standardkurven erstellt, aus denen die den Hemmwerten von Proben mit unbekanntem Wirkstoffgehalt zugehörigen Wirkstoffmengen entnommen werden können. Y i p und C o o k (106) beispielsweise benutzten die manometrische Methode zum Nachweis von Sevin, Parathion, Trithion und Systox. Als Enzymquelle diente Menschenblutserum, das mit Sevin standardisiert wurde. Für Routineuntersuchungen, wie sie etwa im Rahmen der Lebensmittelüberwachung erfolgen sollen, scheint die manometrische Methode wegen der komplizierten Arbeitsweise wenig geeignet.

Andere Verfahren bestehen darin, die gebildete Essigsäure zu titrieren und die verbrauchte Menge alkalischer Maßlösung als Maß für die hydrolytische Aktivität zu benutzen. Solche Methoden wurden zum Beispiel von S t e d m a n und Mitarbeitern (88, 107), die zur Bestimmung des Neutralpunktes einen Farbindikator benutzten, und G l i c k (108), der

während der Hydrolyse den pH-Wert durch elektrometrische Kontrolle konstant hält und die gebildete Essigsäure durch kontinuierliche Zugabe von Natronlauge kompensiert, entwickelt.

Größere Anwendung hat die erstmals von Michael (109) beschriebene Methode, den während der Hydrolyse auftretenden pH-Abfall zu messen, gefunden. Giang und Hall (110) haben das Verfahren zum Nachweis von organischen Phosphorsäureestern in abgewandelter Form herangezogen. Inkubations- und Hydrolysenzeit betragen 30 beziehungsweise 60 min, bei einer Reaktionstemperatur von 25°C. Die Autoren verwenden ein aus Rinderbluterythrozyten hergestelltes standardisiertes Acetylcholinesterasepräparat. Davon bewirken 60 I.E. bei der ungehemmten Vergleichsprobe einen Abfall des Ausgangs-pH-Wertes von 8,1 auf 5,0. Der Berechnung der relativen Hemmwerte werden die Differenzen der pH-Änderungen von ungehemmten und gehemmten Proben zu Grunde gelegt. Dieses als "Δ pH-Methode" bezeichnete analytische Verfahren wurde zum Beispiel von Archer und Zweig (111) zum Nachweis von Sevin in Wein herangezogen, wobei die untere Nachweisgrenze bei 0,5 % lag.

Von Hestrin (112) wurde eine Methode zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität ausgearbeitet, bei der das ungespaltene Acetylcholin erfaßt wird. Sie beruht auf der Beobachtung, daß Acetylcholin im alkalischen Milieu mit Hydroxylamin in stöchiometrischer Reaktion in Acethydroxamsäure und Cholin umgewandelt wird. Mit Ferriionen bildet die Acethydroxamsäure einen rötlich gefärbten Komplex, der im pH-Bereich von 1,0 bis 1,4 beständig ist. Die Hestrin'sche Methode wurde von Cook (113) sowie Diggle und Gage (19) zum quantitativen Nachweis von Systox beziehungsweise Parathion benutzt. Die Berechnung der prozentualen Hemmung beruht auf dem Verbrauch an 0,01 molarer Acetylcholinlösung. Neben wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Ansätzen ist auch ein enzymfreier Ansatz erforderlich. Bei jedem Ansatz wird die gleiche Menge Acetylcholinlösung vorgelegt, die Differenz der Acetylcholinrestmengen von enzymhaltigen und enzymfreien Ansätzen gibt den Substratverbrauch der ersteren an. Die den Extinktionswerten entsprechenden Acetylcholinmengen werden

einer Eichkurve entnommen.

Die colorimetrische Bestimmung der Enzymaktivität läßt sich einfacher gestalten, wenn als Substrate Verbindungen gewählt werden, deren Hydrolysenprodukte entweder direkt optisch auszuwerten sind oder in Farbverbindungen übergeführt werden können. Dazu zählt das von R a v i n , T s o u und S e l i g m a n (114) benutzte *R*-Carbonnaphthoxycholin, dessen Säurekomponente nach der hydrolytischen Spaltung spontan zu *R*-Naphthol decarboxyliert wird. Dieses wird mit Naphthaldiazoblau-B-salz in eine Farbverbindung übergeführt. Die Unterbrechung der Hydrolyse am Ende der Hydrolysenzeit erfolgt mit Trichloressigsäure. M a i n , M i l e s und B r a i d (115) verwenden o-Nitrophenylbutyrat. Das bei der Hydrolyse anfallende o-Nitrophenol zeigt je nach pH-Wert Absorptionsmaxima bei 414 und 348 nm, die zur spektralphotometrischen Messung herangezogen werden können. In abgewandelter Form verwendet C a s i d a (116) diese Methode zum quantitativen Nachweis organischer Phosphorverbindungen. Das von B a r n e t t und S e l i g m a n (117) zum histochemischen Nachweis von Cholinesterasen benutzte Indophenylacetat wurde von K r a m e r und G a m s o n (118) für eine quantitative Bestimmungsmethode herangezogen. A r c h e r und Z w e i g (119) benutzten diese Methode zur Bestimmung von Sevin, Guthion, Thimet und Trithion. Das Absorptionsmaximum des bei der Hydrolyse entstehenden Indophenols ist nach K r a m e r und G a m s o n stark pH-abhängig. A r c h e r und Z w e i g messen die Extinktion bei 625 nm bei einem pH-Wert von 8,0 ohne Unterbrechung der enzymatischen Reaktion unmittelbar nach Beendigung der Hydrolysenzeit. Sie benutzten das schon erwähnte standardisierte Acetylcholinesterasepräparat, wovon 150 I.E. pro Ansatz erforderlich sind. Die Autoren prüften die Abhängigkeit der Aktivität von Enzymkonzentration und Reaktionstemperatur. Es zeigte sich, daß die optimale Enzymkonzentration bei 15 bis 25 I.E./ml Reaktionslösung lag und daß die hydrolytische Aktivität bei einer Temperaturerhöhung bis etwa 50°C ansteigt und danach, wahrscheinlich infolge Denaturierung des Enzymes, rasch abfällt. Weiter wurde der Einfluß der

Inkubationsdauer auf die Inhibitorwirkung von Sevin geprüft, wobei sich ergab, daß eine mehr als 30 min betragende Inkubationszeit kaum noch ein Ansteigen der Hemmung bewirkt.

G o m o r i (120) benutzt zum histochemischen Nachweis von Cholinesterasen Fettsäureester des Phenols, des Naphthols und des Naphthol-AS'. Die bei der Hydrolyse entstehenden phenolischen Verbindungen werden wie bei R a v i n , T s o u und S e l i g m a n mit einem Diazosalz in Farbverbindungen übergeführt. Zur Bestimmung der Hydrolysen-geschwindigkeit der von ihm benutzten Ester entwickelte G o m o r i eine quantitative Methode, ähnlich der von R a v i n , T s o u und S e l i g m a n . Dabei ent-fällt jedoch das Ausschütteln der in wäßriger Lösung wenig beständigen Farbverbindung mit Essigsäureaethylester.

G o m o r i fand, daß sich der Farbstoff bei Zugabe von Lö-sungsvermittlern auch in wäßriger Lösung kaum verändert. Be-sonders eignen sich dafür Brij 35, ein Polyäthylenglykollau-rylalkohol, und Natriumlaurylsulfat. Letzteres hat den zu-sätzlichen Vorteil, die Hydrolyse spontan zu unterbinden.

G o m o r i verwendet als Reagenslösung eine Mischung aus 13 bis 15 ml 5%iger wäßriger Natriumlaurylsulfatlösung und einer Lösung von 100 mg Echtblau-B-salz in 6 bis 7 ml Wasser.

V a n A s p e r e n (121), der die Gomori'sche Methode bei Hemmversuchen an Hausfliegenesterasen benutzte, verwendet eine Mischung aus 5 ml 5%iger Natriumlaurylsulfatlösung und 2 ml einer 1%igen Echtblau-B-salzlösung. Die Farbverbindun-gen der beiden Naphtholisomeren sind nach Angabe von G o - m o r i bei pH = 6,0 bis 8,0 mehrere Stunden beständig. Mit *R*-Naphthol entsteht eine intensiv rote Farbe, die Farbe der α -Naphtholverbindung geht von einem anfänglichen Purpurrot rasch nach Blau über.

Bei der von G o m o r i angegebenen Methode findet ein 0,2 molarer Phosphatpuffer Verwendung, der pro Liter 16,72 g NaHPO_4 12 H_2O und 2,72 g KH_2PO_4 enthält und dessen pH-Wert bei 7,2 liegt. Zur Bereitung der Substratlösungen aus den nur schwer wasserlöslichen Estern werden zunächst 0,03 mo-lare acetonige Stammlösungen hergestellt. Durch Verdünnen mit 75 Teilen Wasser und 24 Teilen Phosphatpufferlösung

werden daraus 3×10^{-4} molare Gebrauchslösungen bereitet, deren Acetongehalt von 1 % keinen Einfluß mehr auf die enzymatische Reaktion hat. Pro Ansatz werden 5 ml Substratlösung und 1 ml des mit Pufferlösung verdünnten Enzympräparates (Menschenblutserum) verwendet.

Gegenüber anderen colorimetrischen Methoden zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterase bietet die von G o m o r i angegebene Methode den Vorzug, die Messung der Farbintensität ohne Einschaltung weiterer Arbeitsgänge direkt in der Reaktionslösung vornehmen zu können.

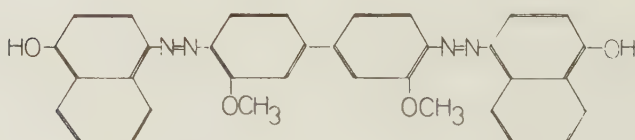
Mit der vorliegenden Arbeit wird die Absicht verfolgt, die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach dem von G o m o r i entwickelten Prinzip und unter Verwendung des bereits erwähnten standardisierten Acetylcholinesterasepräparates der Fa. Winthrop zum Nachweis einer Reihe von Insektiziden mit cholinesteraseblockierender Wirkung heranzuziehen. Weitere Versuche sollen darüber Aufschluß geben, wie weit die Möglichkeit besteht, mit Hilfe dieses Prinzipes die Cholinesterasehemmung bei dem papierchromatographischen Nachweis organischer Phosphorsäureester anzuwenden.

Experimenteller Teil
=====

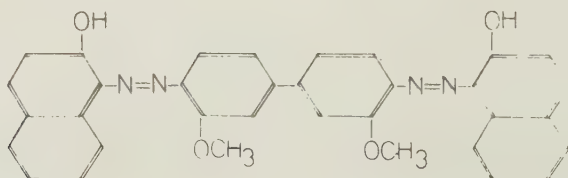
1. Meßbedingungen

G o m o r i (120) macht sich bei seiner Methode zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Cholinesterase den Umstand zu Nutze, daß dieser Enzymkomplex neben Cholinesterase auch nicht Cholinester zu spalten vermag (96, 97). Das bei der Hydrolyse entstehende Naphthol läßt sich mit einer Diazoverbindung auf einfache Weise in einen Farbstoff überführen. Echtblau-B-salz, das von G o m o r i als Reagens angegeben wird, ist das bisdiazotierte o-Dianisidin, das durch Kupplung mit geeigneten Komponenten substantive Farbstoffe liefert (122). Die Kupplung von Diazoniumsalzen mit Naphtholen erfolgt in alkalischer Lösung in p-Stellung zur Hydroxylgruppe, bei p-substituierten Naphtholen in o-Stellung (123). Den bei der Reaktion von Echtblau-B-salz mit α - und β -Naphthol in alkalischer Lösung entstehenden Farbstoffen wären danach folgende Strukturformeln zuzuschreiben:

Für α -Naphthol



Für β -Naphthol



Den Stabilisierungseffekt des Natriumlaurylsulfates führt G o m o r i auf dessen Eigenschaft als Lösungsvermittler zurück. Eine Erklärung für die spontane Unterbrechung der enzymatischen Reaktion wird nicht gegeben.

Zur colorimetrischen Bestimmung der Farbtintensität war es erforderlich, die Lage der Extinktionsmaxima der beiden Farbverbindungen zu bestimmen sowie die Beständigkeit der Farbtintensität im Dunkeln und unter Lichteinwirkung zu überprüfen. Von den Bedingungen für die enzymatische Reaktion waren das Volumen der Reaktionslösung, der pH-Wert sowie Menge und Zusammensetzung der zur Farbbildung und Unterbrechung der Hydrolyse erforderlichen Reagenslösung von Anfang festgelegt. Das Reaktionsvolumen wurde zur leichteren Dosierung der in Zehnerpotenzen angegebenen Wirkstoffkonzentrationen auf 10 ml festgesetzt. Zu dieser Flüssigkeitsmenge wurden nach Beendigung der Hydrolysenzeit 3 ml der von v a n A s p e r e n angegebenen Reagenslösung aus 5%iger wäßriger Natriumlaurylsulfatlösung und 1%iger wäßriger Echtblau-E-salzlösung im Verhältnis 5 : 2 gegeben. Als Reaktionsgefäße wurden 25 ml fassende Meßkolben benutzt. Nach Zugabe der Reagenslösung wurde mit destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Die Hydrolyse erfolgte bei dem von G o m o r i angegebenen optimalen pH-Wert von 7,2, der durch Verwendung des 0,2 molaren Phosphatpuffers erhalten wird. Diese Anordnung wurde allen Versuchen zu Grunde gelegt.

Verlauf der Extinktionskurven

Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Farbe der α -Naphtholfarbstoffverbindung von dem pH-Wert der Lösung abhängig ist. Die in pufferfreier Lösung rubinrote Farbe ging bei pH = 7,2 von einem anfänglichen Rot rasch nach Blau über. Demgegenüber wurde die Farbe der β -Naphtholverbindung nicht von dem pH-Wert der Lösung beeinflusst. Der Verlauf der Extinktionskurven sollte Aufschluß geben über Lage und Form der Extinktionsmaxima in gepufferter und in pufferfreier Lösung.

Hierzu wurden 10^{-2} molare acetone Lösungen von α - und β -Naphthol hergestellt, von denen je 1 ml mit Phosphatpufferlösung auf 100 ml verdünnt wurde, so daß eine Endkonzentration von 10^{-4} resultierte. In der gleichen Weise wurden aus den acetone Stammlösungen pufferfreie wäßrige α - und β -Naphthollösungen mit der gleichen Naphtholkonzentration hergestellt. Je 3,75 ml dieser Lösungen wurden in 25ml-Meßkolben gegeben. Die gepufferten Ansätze wurden mit Pufferlösung auf 10 ml ergänzt. Jeder Ansatz wurde mit 3 ml Reagenslösung versetzt und mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Farbintensität entsprach der $1,5 \times 10^{-5}$ molarer Naphthollösungen. Die pH-Werte der pufferhaltigen Ansätze lagen zwischen 7,14 und 7,20, die der pufferfreien Ansätze zwischen 5,75 und 5,80. Die Aufnahme der Extinktionskurven erfolgte mit einem Spektralphotometer mit automatischer Extinktionsschreibung 15 min nach Reaktionsbeginn gegen in gleicher Weise hergestellte naphtholfreie Vergleichslösungen. Während der 15 min standen die Lösungen im Gerät, die Küvette mit der Vergleichslösung im Strahlengang.

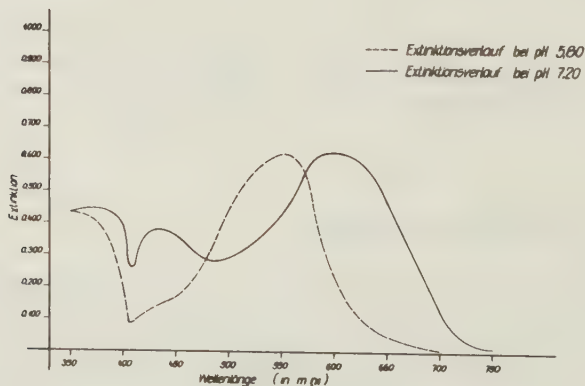


Abb. 1 Extinktionsverlauf der α -Naphtholfarbstoffverbindung in pufferhaltiger (—) und pufferfreier (---) Lösung.

Die pH-Abhängigkeit der Farbe der α -Naphtholfarbstoffverbindung ist auf Abbildung 1 an der Verschiebung der Lage des Extinktionsmaximums zu erkennen. Das bei pH = 7,2 bei 600 bis 610 nm liegende Maximum erscheint nicht so scharf ausgeprägt wie das der pufferfreien Lösung. Demgegenüber wird die Lage des Extinktionsmaximums der β -Naphtholfarbstoffverbindung durch pH-Änderungen im Bereich zwischen 5,75 und 7,14 nicht beeinflusst.

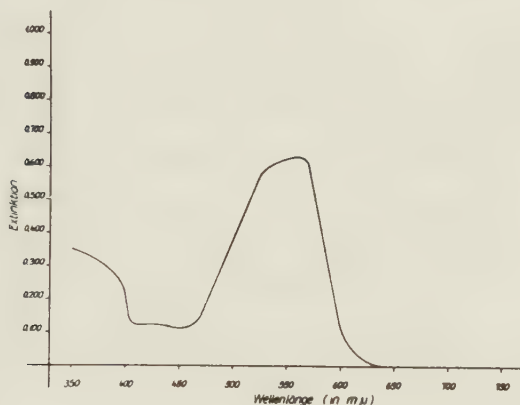


Abb. 2 Extinktionskurve des β -Naphtholfarbstoffkomplexes im pH-Bereich zwischen 5,75 und 7,14

Feständigkeit der Farbtintensität

Zur Prüfung der Feständigkeit der Farbtintensität beider Farbstoffverbindungen wurden die Extinktionswerte der Farbstofflösungen verschiedener α - und β -Naphtholkonzentrationen über 45 min verfolgt. Die einzelnen Ansätze wurden in der beschriebenen Weise hergestellt, der pH-Wert lag jeweils bei 7,2. Die Messungen wurden mit einem Spektralphotometer bei 600 beziehungs-

weise 555 nm gegen naphtholfreie Vergleichslösungen mit gleichem pH vorgenommen. Die Extinktionswerte beziehen sich auf eine Schichtdicke von 1,000 cm. Die Messungen erfolgten in der Zeit von 0 bis 10 min in zweiminütigem Abstand. Zwischen den Messungen befand sich die Küvette mit der Vergleichslösung im Strahlengang.

Tab. 1 Extinktionswerte des α -Naphtholfarbkomplexes

Zeit (min)	Konzentrationen (molar)				
	2×10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$
2	0,090	0,196	0,430	0,629	0,914
4	0,084	0,215	0,428	0,677	0,995
6	0,083	0,205	0,426	0,702	0,999
8	0,083	0,211	0,425	0,710	0,998
10	0,083	0,206	0,425	0,710	0,998
15	0,084	0,206	0,424	0,716	0,990
20	0,084	0,207	0,424	0,716	0,990
25	0,083	0,207	0,426	0,717	0,990
30	0,084	0,207	0,425	0,716	0,990
35	0,084	0,208	0,425	0,716	0,990
40	0,083	0,207	0,426	0,716	0,991
45	0,084	0,207	0,424	0,717	0,991

Wie aus den Tabellen 1 und 2 zu erkennen ist, bleibt die Farbtintensität beider Lösungen über die verfolgte Zeitspanne nahezu konstant. Der bei der α -Naphtholfarbverbindung beobachtete Umschlag von purpurrot nach blau muß bereits innerhalb der ersten beiden Minuten erfolgen, da anderenfalls die nach dieser Zeit bei 600 nm gemessenen Extinktionswerte bedeutend niedriger liegen müßten. Lediglich bei den höheren Naphtholkonzentrationen ist noch ein geringfügiges Ansteigen

der Extinktion zu erkennen.

Tab. 2 Extinktionswerte des *R*-Naphtholfarbkomplexes

Zeit (min)	Konzentrationen (molar)				
	3×10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$
2	0,128	0,195	0,409	0,722	1,015
4	0,121	0,182	0,410	0,669	1,005
6	0,115	0,182	0,415	0,726	1,005
8	0,119	0,178	0,421	0,726	1,015
10	0,120	0,175	0,425	0,730	1,022
15	0,119	0,177	0,425	0,730	1,025
20	0,120	0,187	0,418	0,731	1,025
25	0,120	0,187	0,419	0,732	1,024
30	0,120	0,189	0,420	0,733	1,030
35	0,120	0,197	0,421	0,732	1,030
40	0,121	0,199	0,422	0,720	1,035
45	0,120	0,200	0,421	0,722	1,040

Für die α -Naphtholverbindung beträgt der durchschnittliche relative Fehler (Abweichung), bezogen auf den mittleren Extinktionswert für alle aufgeführten Konzentrationsstufen für die zwischen 2 und 45 min gemessenen Einzelwerte $\pm 1,1 \%$, für die von 20 bis 45 min gemessenen Werte weniger als $\pm 0,1 \%$. Etwas weniger konstant sind die bei 555 nm gemessenen Werte der *R*-Naphtholfarbverbindung. Die entsprechenden relativen Fehler liegen bei $\pm 2,2 \%$ beziehungsweise $\pm 1,5 \%$. Dies bedeutet, daß sich die Farbtintensität beider Lösungen innerhalb der ersten 45 min praktisch nicht ändert.

Für gleiche Naphtholkonzentrationen sind die Extinktionswerte der beiden Farbverbindungen praktisch gleich, wie aus Abbildung 3, die die Abhängigkeit der Extinktion von den molaren Naphtholkonzentrationen wiedergibt, zu erkennen ist.

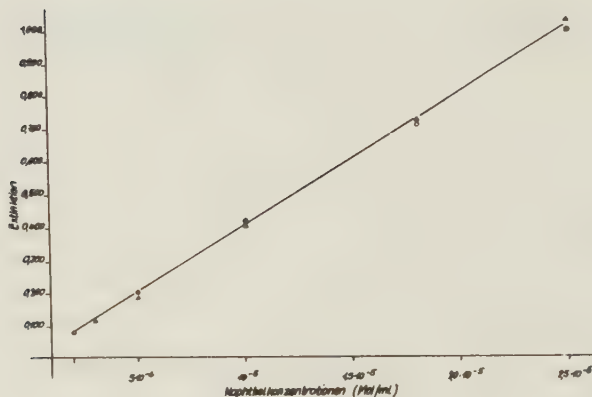


Abb. 3 Extinktionswerte des α -(-o-) und β -Naphtholfarbstoffes (- Δ -) in Abhängigkeit von der Naphtholkonzentration; Schichtdicke 1,000 cm

Der Einfluß des Lichtes auf die Farbbeständigkeit

Um den Einfluß des diffusen Tageslichtes auf die Beständigkeit der Farbtintensität festzustellen, wurden für jedes der beiden Naphtholisomeren sieben Ansätze mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^{-5}$ M bereitet, die unterschiedlich lange der Tageslichteinstrahlung ausgesetzt wurden. Die nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min gemessenen Extinktionswerte der einzelnen Ansätze lassen bei einem Vergleich mit den entsprechenden Werten gleichkonzentrierter zwischen Zugabe der

Reagenslösung und Messung der Extinktionswerte im Spektralphotometer gehaltenen Proben eine deutliche Abnahme der Farbintensität erkennen. (Abb. 4)

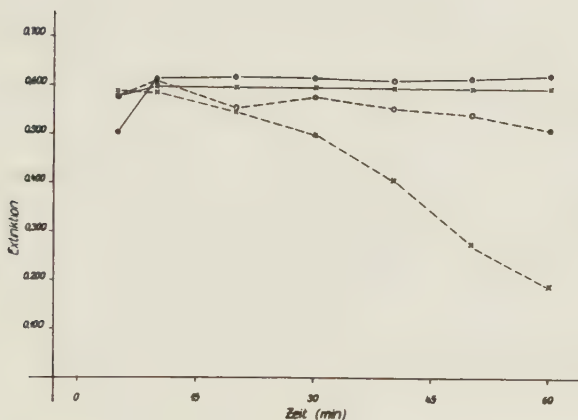


Abb. 4 Verlauf der Extinktionskurven der α -(-x-) und β -Naphtholfarbstoffverbindung (-o-) bei Aufbewahrung im Dunkeln (—) und im Tageslicht (---)

Ergebnisse

Die Versuche zeigen, daß die größte Genauigkeit bei der Messung der Extinktionswerte in der Zeit zwischen 20 und 45 min nach Zugabe der Reagenslösung erreicht wird. Bis zur Messung müssen die Farblösungen im Dunkeln aufbewahrt werden. Bei Verwendung eines Spektralphotometers werden die Messungen bei 600 nm (α -Naphthol) und 555 nm (β -Naphthol) vorgenommen. Daneben besteht die Möglichkeit, die Messungen mit einem Photometer vom Typ des Elko II-Gerätes unter Verwendung der

Filter S 59 beziehungsweise S 55 vorzunehmen. Die Differenzen zwischen den Werten der Extinktionsmaxima und den Extinktionswerten bei 590 und 550 nm betragen jeweils weniger als 1 %.

2. Bereitung der Enzym- und Substratlösung

Enzymlösung

Zum quantitativen Nachweis von Phosphorsäureestern mit Hilfe der Cholinesterasehemmung ist es zweckmäßig, ein weitgehend gereinigtes Präparat mit bekanntem Enzymgehalt zu verwenden. Werden ungereinigte Präparate mit unbekanntem Enzymgehalt benutzt, ist für jede Bestimmung die Erstellung einer eigenen Standardkurve erforderlich. Der Wert einer Standardisierung solcher Präparate mit Hilfe eines Wirkstoffes erscheint fraglich, da die Begleitstoffe einen Anteil des Wirkstoffes der Einwirkung auf das Enzym entziehen dürften. Ein Präparat, das zum Nachweis von Insektiziden geeignet ist, stellt die aus Rindererythrozyten hergestellte Acetylcholinesterase der Fa. Winthrop-Stearns⁺ dar. Das Präparat wird in Form von Trockenampullen in den Handel gebracht, die 20 000 der von A m m o n (89) definierten internationalen Einheiten in wasserlöslicher Form enthalten.

G i a n g und H a l l (110) verwenden zur Herstellung einer Stammlösung mit einem Gehalt von 1000 I.E. pro ml physiologische Kochsalzlösung. Die Gebrauchslösung wird durch Verdünnen mit Pufferlösung hergestellt. Bei 0 bis 5°C soll sich die Stammlösung ohne Aktivitätsverlust längere Zeit aufbewahren lassen.

Für die eigenen Versuche erschien es zweckmäßig, eine Stammlösung mit einem niedrigeren Enzymgehalt herzustellen. Als Lösungsmittel diente Phosphatpufferlösung. Mit einer Injektionsspritze wurden 10 ml der eisgekühlten Pufferlösung durch den Gummipropfen in die Ampulle injiziert und der Inhalt durch Umschütteln gelöst. Die gelblich-braune, trübe Lösung wurde unter mehrmaligem Nachspülen mit Pufferlösung quantitativ in einen sterilen 200 ml fassenden Meßkolben übergeführt und mit weiterer eiskalter Pufferlösung bis zur Marke aufgefüllt.

⁺ Winthrop-Stearns Lab., 33 Riverside Avenue Reusselaer, New York, USA

Die Enzymlösung mit einem Gehalt von 100 I.E. pro ml wurde in Mengen von je 5 ml in sterile Gläser mit Kunststoffkappenverschluß abgefüllt. In gefrorenem Zustand konnte die Stammlösung im Tiefkühlfach eines Kühlschranks mehrere Monate ohne erkennbaren Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Zur Bereitung der Gebrauchslösung wurde die eingefrorene Stammlösung bei Raumtemperatur vorsichtig so weit aufgetaut, daß gerade die benötigte Menge entnommen werden konnte. Die Entnahme erfolgte mit einer geeichten 1ml-Pipette, die Verdünnung der Stammlösung wurde im Verhältnis 1 : 10 mit eiskühler Phosphatpufferlösung vorgenommen. Die Gebrauchslösung konnte einige Tage bei 0 bis 5°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne daß Aktivitätsverluste eintraten.

Ältere Lösungen wurden verworfen. Da bei dem Auftauprozess Aktivitätsverluste auftreten können, wurden eventuelle Restmengen an Stammlösung nach zweimaligem Auftauen nicht mehr für quantitative Bestimmungen verwendet.

Substratlösung

G o m o r i (120) stellte fest, daß α -Naphthylacetat durch Menschenblutserum besser hydrolysiert wird als β -Naphthylacetat. Er setzte die in einer Stunde bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4 hydrolysierte α -Naphthylbutyratmenge gleich 1000 und erhielt für α -Naphthylpropionat, α - und β -Naphthylacetat Verhältniszahlen von 900, 700 und 400. Zu einem ähnlichen Resultat kam v a n A s p e r e n (121), der für α -Naphthylacetat einen K_m -Wert von 10^{-4} M und für β -Naphthylacetat einen K_m -Wert von $2,3 \times 10^{-4}$ für die von ihm untersuchten Hausfliegenesterasen feststellte. Da der K_m -Wert die Substratkonzentration darstellt, bei der 50 % der für die gegebenen Bedingungen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden, bedeutet der niedrigere K_m -Wert von α -Naphthylacetat eine gegenüber β -Naphthylacetat raschere Umsetzung. Dies besagt, daß bei gleicher α - und β -Naphthylacetatkonzentration die α -Form eine niedrigere Enzymkon-

zentration für die gleiche Umsetzungsgeschwindigkeit erfordert. Dieser Gesichtspunkt war dafür entscheidend, daß bei den eigenen Versuchen die α -Verbindung benutzt wurde.

Die Bereitung der Substratlösung erfolgte in der von G o - m o r i beschriebenen Art. Aus dem schlecht wasserlöslichen α -Naphthylacetat wurde zunächst eine 0,01 molare acetonige Lösung hergestellt, aus der bei Bedarf durch Verdünnen mit der 0,2 molaren Phosphatpufferlösung eine Gebrauchslösung in der gewünschten Konzentration hergestellt werden konnte. Im Gegensatz zu der acetonigen Stammlösung, die einige Monate ohne Zersetzungserscheinungen aufbewahrt wurde, ließ sich die mit Phosphatpuffer hergestellte Gebrauchslösung stets nur kurze Zeit unzersetzt aufbewahren. Sie wurde in der Regel vor Gebrauch frisch bereitet.

3. Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Die Geschwindigkeit der hydrolytischen Spaltung von α -Naphthylacetat durch die Acetylcholinesterase wird durch die Enzym- und Substratkonzentration, die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit sowie den pH-Wert der Reaktionslösung bestimmt. Für die angestrebte analytische Methode waren diese Faktoren außer dem pH-Wert, der durch die Verwendung der Pufferlösung nach G o m o r i konstant blieb, so zu wählen, daß der Extinktionswert der wirkstofffreien Bezugsprobe nach dem Verdünnen der Reaktionslösung auf 25 ml für eine Schichtdicke von 1,000 cm aufgenommen mit dem Elko II-Gerät unter Verwendung des Filters S 59 etwa bei 1,000 lag. Die Extinktionswerte der wirkstoffhaltigen Ansätze, bei denen die hydrolytische Aktivität gegenüber der Bezugsprobe herabgesetzt ist, müssen unter 1,000 liegen. Die Bestimmung der optimalen Enzym- und Substratkonzentration, der optimalen Reaktionstemperatur und Reaktionszeit wurde in der von A r c h e r und Z w e i g (119) beschriebenen Weise vorgenommen. Diese untersuchten den Einfluß von Enzymkonzentration und Reaktionstemperatur auf die Hydrolyse von Indophenylacetat, indem sie jeweils eine dieser Größen variierten und die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit an Hand der Extinktionswerte verfolgten. Der Einfluß von Substratkonzentration, Hydrolysenzeit und pH-Wert auf den Reaktionsablauf wurde von A r c h e r und Z w e i g nicht untersucht.

Enzym- und Substratkonzentration

Enzym- und Substratkonzentration sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da, wie noch ausgeführt wird, davon in erster Linie die Erfassungsgrenze abhängt. Die Reaktionszeit und die Reaktionstemperatur sind so zu wählen, daß

eventuell auftretende Schwankungen das Reaktionsergebnis möglichst wenig beeinflussen. Bei der Bestimmung der optimalen Enzym- und Substratkonzentrationen wurden die Reaktionszeit auf 30 min und die Reaktionstemperatur auf 40°C festgelegt. Sie bewegten sich damit, wie weitere Versuche zeigten, in einem günstigen Bereich.

Insgesamt wurden sechzehn Enzym-Substratkombinationen, und zwar die Enzymkonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 I.E. pro ml mit den 2×10^{-5} , 5×10^{-5} , 8×10^{-5} und 10^{-4} molaren α -Naphthylacetatkonzentrationen auf ihre hydrolytische Aktivität hin untersucht. In vier 25ml-Meßkolben wurden 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ml der Gebrauchslösung entsprechend 5, 10, 15, 20 I.E. vorgelegt und mit kalter Pufferlösung auf 9 ml ergänzt. Daneben wurde eine enzymfreie Probe mit 9 ml Pufferlösung angesetzt. Die Meßkolben wurden in einen Thermostaten mit einer Wassertemperatur von 40°C gesetzt. Wie aus Abb. 5 zu erkennen ist, steigen die Temperaturen in einem 9 ml-Phosphatpuffervolumen unter den angegebenen Bedingungen nahezu unabhängig von der Ausgangstemperatur innerhalb von 5 min auf etwa 39,0°C an.

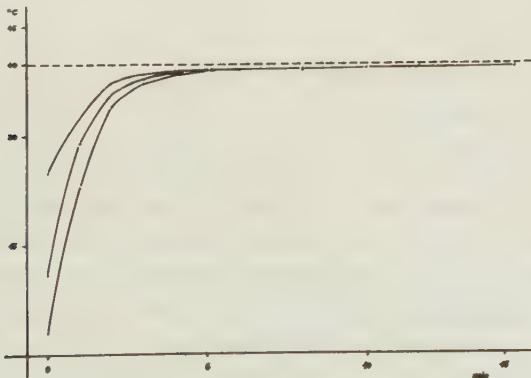


Abb. 5 Temperaturanstieg in einem 9 ml-Phosphatpuffervolumen bei 40°C Außentemperatur für verschiedene Ausgangstemperaturen

Die Annäherung an die 40°C -Grenze erfolgt nur sehr langsam, nach 15 min beträgt die Temperatur etwa $39,5^{\circ}\text{C}$. Da bei längerem Temperieren mit Aktivitätsverlusten zu rechnen ist, wurde die Temperierzeit auf 10 min begrenzt. Die Temperatur der Reaktionslösung beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa $39,4^{\circ}\text{C}$. Nach Ablauf der Temperierzeit wurde jedem Ansatz 1 ml einer 2×10^{-4} molaren Substratlösung hinzugefügt. Die Substratkonzentration des danach 10 ml betragenden Reaktionsvolumens betrug 2×10^{-5} M. Nach 30 min wurde die Hydrolyse durch Zugabe der Reagenslösung unterbrochen und die Meßkolben mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Nach weiteren 20 min, während denen die Ansätze im Dunkeln aufbewahrt wurden, wurden die Extinktionswerte gegen eine Vergleichslösung aus 3 ml Reagenslösung, 10 ml Pufferlösung und 12 ml destilliertem Wasser gemessen.

In gleicher Weise wurden Versuchsreihen mit 5×10^{-5} , 8×10^{-5} und 10^{-4} molaren Substratkonzentrationen, für jede Substratkonzentration in Form dreier Parallelbestimmungen, durchgeführt. Von den Extinktionswerten der Enzymansätze wurde der Extinktionswert der enzymfreien Probe subtrahiert, um so den durch die nichtenzymatische spontane Hydrolyse entstehenden Fehler zu eliminieren.

Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die vier Kurven entsprechen den vier Substratkonzentrationen, die vier Kurvenpunkte jeder Kurve den vier verschiedenen Enzymkonzentrationen. Jeder Kurvenpunkt entspricht dem Mittelwert der drei Einzelbestimmungen. Der mittlere relative Fehler für die Einzelwerte aller Enzym-Substratkombinationen beträgt $\pm 4,0\%$. Der relative Fehler nimmt bei den Enzym-Substratkombinationen mit höheren Extinktionswerten ab.

Die Darstellung zeigt, daß bei einer 8×10^{-5} molaren Substratkonzentration bei Enzymkonzentrationen von mindestens 1,5 I.E. pro ml Extinktionswerte in der gewünschten Größenordnung erhalten werden. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei dieser Substratkonzentration durch höhere Enzymkonzentrationen kaum mehr steigern läßt. Ebenso zeigt sich, daß bei einer Substratkonzentration von 5×10^{-5} M unabhängig von der Enzymkonzentration der angestrebte Extink-

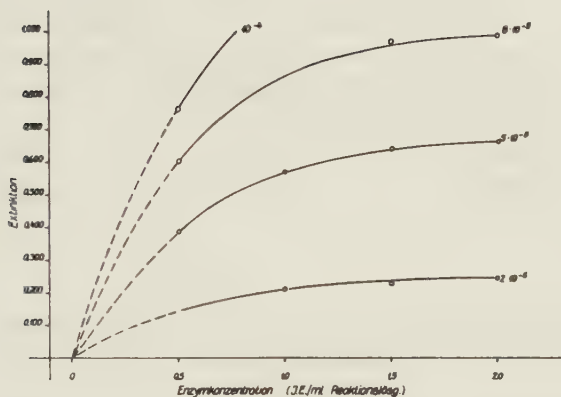


Abb. 6 Extinktionsverlauf für verschiedene α -Naphthylacetatkonzentrationen in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

tionswert von etwa 1,000 nicht erreicht wird.

Die Frage, welche Enzym- und Substratkonzentration für die Nachweisversuche herangezogen werden sollen, wurde auf Grund der Überlegung entschieden, daß mit der Verringerung der Enzymkonzentration die relativen Hemmwerte bestimmter Wirkstoffkonzentrationen ansteigen, wodurch die erfaßbare Wirkstoffkonzentration herabgesetzt wird, daß sich aber andererseits bei niedrigeren Enzymkonzentrationen eventuelle Aktivitätsverluste oder Ungenauigkeiten bei der Dosierung der Wirkstoffe stärker bemerkbar machen. Von den untersuchten Enzym-Wirkstoffkombinationen, die unter den angegebenen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von etwa 1,000 ergeben, scheint die Enzymkonzentration von 1,5 I.E. pro ml zusammen

mit der Substratkonzentration von 8×10^{-5} M am besten geeignet zu sein.

Die Enzymkonzentration liegt beträchtlich unter den von Archer und Zweig sowie Giang und Hall angegebenen Werten von 30 beziehungsweise 10 I.E. pro ml. Die unteren noch zu erfassenden Konzentrationen von Insektiziden mit cholinesteraseblockierender Wirkung müssen damit niedriger liegen als bei den von Archer und Zweig sowie Giang und Hall angegebenen Nachweismethoden.

Bestimmung des Einflusses von Reaktionszeit und Reaktionstemperatur auf die Hydrolysenrate

Bei der Bestimmung des Einflusses von Enzym- und Substratkonzentration auf den Reaktionsablauf wurde die Forderung gestellt, die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit so zu wählen, daß eventuelle Schwankungen keine wesentliche Änderung des Reaktionsablaufes zur Folge haben. Die folgenden Versuche sollten zeigen, wie weit diese Forderung den bei der Bestimmung von Enzym- und Substratkonzentration angenommenen Werten von 40°C beziehungsweise 30 min erfüllt ist.

Um die Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Reaktionstemperatur zu studieren, wurden Doppelbestimmungen mit Enzymgehalten von 1,5 I.E. pro ml bei einer 8×10^{-4} molaren Substratkonzentration in der üblichen Weise bei Reaktionstemperaturen von 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45°C und einer Reaktionszeit von 30 min durchgeführt.

Die Änderung des Reaktionsablaufes wurde an Hand der Extinktionswerte verfolgt. Zur Kompensation der Spontanhydrolyse wurden in der gleichen Weise enzymfreie Bestimmungen durchgeführt, deren Extinktionswerte von denen der Enzymsätze subtrahiert wurden. Die Einzelwerte der Doppelbestimmungen wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt.

In der gleichen Art wurde die Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Reaktionsdauer untersucht. Bei einer Reaktionstemperatur von 40°C und den gleichen Enzym- und Substratkonzentrationen wurden die Ansätze 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 min der Hydrolyse unterworfen.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen sind in den Abbildungen 7 und 8 graphisch dargestellt.

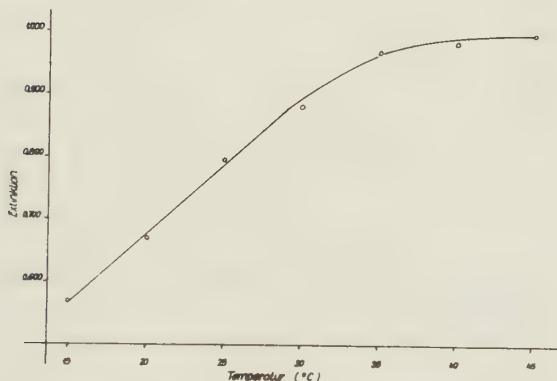


Abb. 7 Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Reaktionstemperatur

Es zeigt sich, daß die Reaktionstemperatur von 40°C für die gegebene Enzym- und Substratkonzentration etwa in der Nähe des Optimums liegt. Weitere Temperaturerhöhungen bewirken kaum noch ein Ansteigen der Reaktionsgeschwindigkeit. A r c h e r und Z w e i g , die die enzymatische Aktivität der Acetylcholinesterase gegenüber Indophenylacetat bei 30, 40, 50 und 60°C untersuchten, stellten ein Ansteigen der Reaktionsgeschwindigkeit parallel zur Temperaturerhöhung bis 50°C fest.

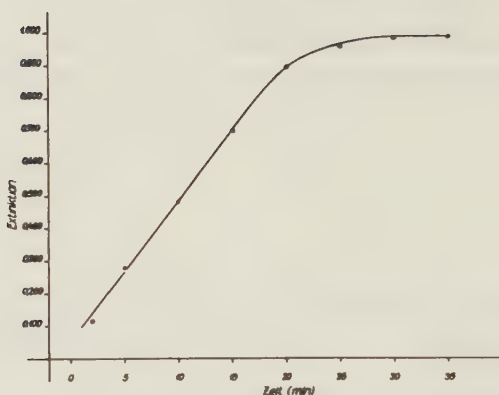


Abb. 8 Abhängigkeit des Reaktionsablaufes von der Reaktionszeit

Oberhalb dieser Temperatur nimmt die Hydrolysenrate rasch ab, sie ist bei 60°C geringer als bei 30°C . Die Erklärung für diesen Abfall sehen Archer und Zweig in der Denaturierung des Enzymproteins bei Temperaturen oberhalb 60°C , was praktisch einer Verminderung der Enzymkonzentration gleichkommt. Wird die Reaktionstemperatur auf 40°C festgesetzt, so bewirken Temperaturschwankungen von $0,1$ bis $0,2^{\circ}\text{C}$ Extinktionsschwankungen von maximal $\pm 0,001$, das bedeutet weniger als 1 %. Ebenso liegt die Reaktionszeit mit 30 min in einem optimalen Bereich. Bei längerer Reaktionszeit ist keine deutliche Erhöhung der Extinktionswerte mehr festzustellen. Schwankungen von ± 1 min haben keine wesentliche Änderung der Extinktion zur Folge. Der in der graphischen

Darstellung angedeutete geradlinige Extinktionsanstieg für die Reaktionszeiten von 1 bis 17 min dürfte nicht den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. Die Abweichung von einer Geraden dürfte jedoch so geringfügig sein, daß sie auf Grund der Schwankungen im Reaktionsablauf bei den der Darstellung zu Grunde gelegten Meßwerten kaum zum Ausdruck kommt.

4. Die Darstellung von Standardhemmwertkurven

Der quantitative Nachweis von Insektiziden mit Hilfe der Cholinesterasehemmung setzt, wie schon in der Einleitung erwähnt, Standardhemmwertkurven voraus, denen die relativen Hemmwerte bekannter Wirkstoffkonzentrationen zu Grunde gelegt sind. Aus den Standardkurven können die unbekannten Wirkstoffmengen vorgereinigter Extrakte aus wirkstoffhaltigem Material an Hand der Hemmwerte erhalten werden. Die Berechnung der Hemmwerte erfolgt aus der Aktivität eines wirkstofffreien Ansatzes und den Aktivitäten wirkstoffhaltiger Ansätze, wobei die Aktivität der wirkstofffreien, ungehemmten Probe gleich 100 gesetzt wird.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Bei den eigenen Versuchen wurde als Maß für die enzymatische Aktivität die unter den in den vorausgegangenen Abschnitten festgelegten Bedingungen erhaltenen Extinktionswerte angenommen. Um die im Verlauf der Inkubations- und Hydrolysenzeit erfolgende spontane, nichtenzymatische Hydrolyse zu kompensieren, wurde bei jeder Hemmwertreihe eine enzym- und wirkstofffreie Probe mitgeführt, deren Extinktionswert von denen der gehemmten und ungehemmten Enzymansätze subtrahiert wurde.

Aus der großen Anzahl der insektiziden Wirkstoffe mit cholinesteraseblockierender Wirkung wurden als Modellsubstanzen folgende organischen Phosphorsäureester ausgewählt: Parathion (E 605), Chlorthion, Phosdrin, Gusathion, Lebaycid (Mercaptophos), Delnav, Malathion, Diazinon, Phosphamidon, Ethion, Dipterex und Metasystox. Hiervon zählen Parathion, Chlorthion, Gusathion, Lebaycid, Delnav, Malathion, Diazinon, Ethion und Metasystox zu den Estern der Thio- oder Dithiophosphorsäure. Die chemischen Bezeichnungen und die Strukturformeln sind im Anhang (S.96 bis 97) aufgeführt. Bei den Präparaten handelt es sich um technische Produkte, deren Reinheitsgrad nach Angaben der Hersteller zwischen 90 und 100 % liegt.

Dauer der Inkubationszeit

Die Blockierung der Acetylcholinesterase durch organische Phosphorsäureester stellt eine Phosphorylierungsreaktion dar (siehe S. 21). Die gleichzeitig erfolgende Dephosphorylierung verläuft im Vergleich dazu so langsam, daß sie im Rahmen der Rückstandsanalyse unberücksichtigt bleiben kann (124). Dies bedeutet, daß nach einer endlichen Zeit der Anteil des blockierten Enzyms konstant ist. Die hierzu erforderliche Zeit sollte mit der Inkubationszeit identisch sein, so daß der Anteil des nichtblockierenden Enzymes über die gesamte Hydrolysenzeit hin konstant bleibt. Aus Untersuchungen, die von N e s h e i m und C o o k (125) mit dem Ziel angestellt wurden, die Abhängigkeit der Cholinesterasehemmung von der Dauer der Inkubationszeit für eine Reihe von Organophosphaten zu überprüfen, zeigte sich, daß zur quantitativen Blockierung zum Teil recht unterschiedliche Zeitspannen erforderlich sind, wobei sowohl die Art des Wirkstoffes als auch die Wirkstoffkonzentration eine Rolle spielen. Höhere Wirkstoffkonzentrationen erfordern eine längere Zeit. So wird bei Diazinon bereits nach einer Inkubationszeit von 15 min eine annähernd maximale Hemmung erreicht, bei Malathion sind dazu etwa 120 min erforderlich. Die entsprechenden Zeitspannen für EPN, Methylparathion, Parathion und Phosdrin bewegen sich zwischen diesen Werten. Ähnlich konnten A r c h e r und Z w e i g (119) bei Sevin, einem Carbamat, nach dreißig- bis vierzigminütiger Inkubationszeit keinen Anstieg der prozentualen Hemmung mehr beobachten. Neben den Wirkstoffkonzentrationen dürfen unabhängig von der Art des Wirkstoffes die Reaktionstemperatur, die von den beiden Autorengruppen mit 37,5°C beziehungsweise 30°C konstant gehalten wurde, insofern eine Rolle spielen, als mit dem Ansteigen der Temperatur die zur quantitativen Blockierung erforderliche Zeit abnimmt.

N e s h e i m und C o o k halten auf Grund der Beobachtung, daß nach einer mehr als 30 min andauernden Inkubationszeit keine besondere Steigerung der prozentualen Hemmung mehr erfolgt, eine 30 min betragende Inkubationszeit, wie sie auch von anderen Autoren (121, 110) angegeben wurde, für ausreichend.

Bereitung der Wirkstofflösungen

Mit Ausnahme von Dipterex sind die bei den Versuchen verwendeten Wirkstoffe nur schwer wasserlöslich, so daß ihre genaue Dosierung anfänglich Schwierigkeiten bereitete. Die Herstellung von Standardlösungen mit Aether oder Aceton, wie sie von G i a n g und H a l l (110) beschrieben wurde, und die Entfernung der organischen Lösungsmittel durch Verdampfen im Kaltluftstrom brachte keine befriedigenden Ergebnisse. Wahrscheinlich werden die nach dem Verdampfen der Lösungsmittel an den Wänden der Reaktionsgefäße haftenden Wirkstoffe nicht oder nur unvollkommen in der wäßrigen Enzym-Pufferlösung gelöst.

Es lag nahe, die Wirkstoffe zunächst in einer geringen Menge eines organischen Lösungsmittels zu lösen und die Lösung dann mit Hilfe eines Lösungsvermittlers in eine wäßrige Suspension zu überführen, die dann direkt der Reaktionslösung zugesetzt werden kann. Als Lösungsvermittler wurde Tween 80, ein Polyoxyaethylenderivat des mit Oleinsäure veresterten Sorbitanhydrides benutzt, als Lösungsmittel schießen Aethanol und Aceton geeignet. Da organische Lösungsmittel die Aktivität von Enzymen beeinflussen können, war es erforderlich, Aethanol und Aceton auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Acetylcholinesterase zu prüfen.

Hierzu wurden Versuchsreihen mit einem Gehalt von 8×10^{-2} , 5×10^{-2} , 2×10^{-2} , 10^{-3} , 2×10^{-4} , 10^{-4} und 10^{-5} ml 96%igem unvergälltem Alkohol und 5×10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 5×10^{-7} ml Aceton pro ml Reaktionslösung durchgeführt. Für jede dieser Konzentrationsstufen wurde eine Stammlösung mit einer um eine Zehnerpotenz höheren Konzentration hergestellt. Entsprechend der Zahl der zu untersuchenden Konzentrationsstufen wurden eine Reihe von 25ml-Meßkolben mit 1,5 ml Gebrauchslösung gleich 15 I.E. und 7,5 ml Phosphatpufferlösung versetzt und in einem Thermostaten von 40°C 10 min temperiert. In Abständen von 1 min wurden die Ansätze mit je 1 ml der Stammlösungen versetzt und 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die durchnumerierten Ansätze wiederum in einminütigem Abstand in der gleichen Reihenfolge wie

zuvor mit je 1 ml der 8×10^{-4} molaren Substratlösung versetzt und weitere 30 min der Hydrolyse unterworfen. Die Zugabe der Reagenslösung nach Beendigung der Hydrolysenzeit erfolgte wie die der Substratlösung im Abstand von jeweils 1 min. Die Bestimmung der Farbintensität erfolgte in der üblichen Weise. Neben den aethanol- beziehungsweise acetonhaltigen Ansätzen wurden eine ungehemmte und eine enzymfreie Probe zur Bestimmung der Spontanhydrolyse mitgeführt. Die Berechnung der relativen Hemmwerte erfolgte nach der Gleichung:

$$\frac{(E_0 - E_s) - (E_a - E_s)}{(E_0 - E_s)} \times 100 = \text{Hemmung in Prozent}$$

E_0 entspricht dem Extinktionswert der ungehemmten Vergleichsprobe, E_a bedeutet die Extinktion der gehemmten Ansätze und E_s die Extinktion der Spontanhydrolyse.

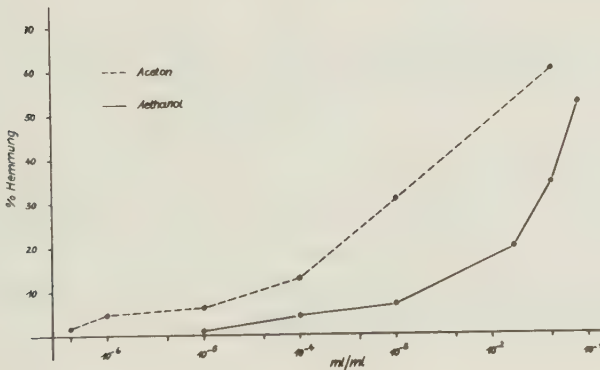


Abb. 9 Hemmwertkurven von Aethanol und Aceton

Jede der beiden Hemmwertreihen wurde doppelt bestimmt und aus den zugehörigen Einzelwerten der Mittelwert berechnet.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in der Abbildung 9 wiedergegeben. Die Darstellung zeigt, daß die Aktivität des Acetylcholinesterasepräparates durch Aceton in größerem Umfang als durch Aethanol beeinträchtigt wird. Aethanol scheint daher für den vorgesehenen Verwendungszweck besser geeignet zu sein als Aceton. Sieht man eine Hemmung der enzymatischen Aktivität durch das in der Reaktionslösung mit vorhandene Aethanol von etwa 3 bis 5 % als tragbar an, so darf die Aethanolkonzentration maximal 5×10^{-4} ml pro ml Reaktionslösung betragen. Andererseits liegen bei den untersuchten Wirkstoffen die höchsten I_{90} -Dosen, das heißt die Dosen, die eine 90%ige Hemmung bewirken und damit etwa die obere Grenze der Hemmbereiche darstellen, bei einer Enzymkonzentration von 1,5 I.E. pro ml bei maximal 10^{-5} g/ml Reaktionslösung. Dies bedeutet, daß ein Verhältnis von Millilitern Aethanol zu Gramm Wirkstoff von mindestens 5×10^{-4} zu 10^{-5} oder 5 zu 0,1 tragbar ist.

Die Bereitung der Stammlösungen erfolgte danach in der Art, daß 100 mg des Insektizides in ein 10ml-Becherglas eingewogen und in 3 ml 96%igem unvergälltem Aethanol gelöst wurden. Unter Nachspülen mit 2 ml Aethanol wurde die Wirkstofflösung quantitativ in einen 100 ml fassenden Meßkolben übergeführt. Nach Zusatz von 0,5 ml Tween 80 wurde mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung mit einem Wirkstoffgehalt von 10^{-3} g/ml wurden die für die Hemmwertreihen benötigten Wirkstoffkonzentrationen durch Verdünnen um jeweils eine Zehnerpotenz hergestellt. Die bei einer Konzentration von 10^{-3} g/ml meist noch milchig trüben Lösungen waren ab 10^{-5} bis 10^{-6} g/ml völlig klar.

Bestimmung der relativen Hemmwerte

Die zur Darstellung der Standardkurven erforderlichen Hemmwertreihen wurden nach der gleichen Methode erhalten, die zur Bestimmung der Hemmwirkung von Aethanol und Aceton

benutzt wurde. Sie gleicht im Prinzip den von G i a n g und H a l l (110) und C o o k (113) angegebenen Verfahren.

Von jedem Wirkstoff wurden die Hemmwerte von fünf oder sechs Konzentrationsstufen bestimmt. Die Konzentrationen beziehen sich auf die Reaktionslösung, sie sind so gewählt, daß sich die relativen Hemmwerte etwa gleichmäßig über den Bereich von 10 bis 90 % verteilen.

Bei den Bestimmungen wurde im einzelnen wie folgt verfahren:

1. Für jede der zu untersuchenden Wirkstoffkonzentrationen wurde eine Lösung mit einer um eine Zehnerpotenz größeren Konzentration hergestellt.
2. Je nach Anzahl der zu untersuchenden Konzentrationsstufen wurden fünf oder sechs 25ml-Meßkolben mit 1,5 ml Enzymgebrauchslösung gleich 15 I.E. versetzt und mit Phosphatpufferlösung auf 9 ml ergänzt. Daneben wurden zwei weitere Ansätze mit 1,5 ml Gebrauchslösung und 8,5 ml Pufferlösung beziehungsweise mit 10 ml Pufferlösung zur Bestimmung der ungehemmten Aktivität sowie der Spontanhydrolyse angesetzt.
3. Die durchnummerierten Ansätze wurden im Abstand von 1 min in einen Thermostaten mit einer Wassertemperatur von 40°C gesetzt und 10 min temperiert.
4. Die fünf oder sechs Analysenansätze wurden in der gleichen Reihenfolge wie zuvor mit 1 ml je einer der Wirkstofflösungen versetzt und danach zusammen mit den beiden übrigen Ansätzen 30 min inkubiert.
5. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz in der gleichen Reihenfolge und dem gleichen zeitlichen Abstand wie vorher mit 1 ml Substratlösung versetzt. Daran schloß sich die 30 min dauernde Hydrolyse an.
6. Nach Beendigung der Hydrolysenzeit wurde jeder Ansatz mit 3 ml Reagenslösung versetzt, wobei der gleiche zeitliche Abstand wie zuvor eingehalten wurde.

Die Bestimmung der Extinktionswerte erfolgte in der üblichen Weise. Zur Berechnung der prozentualen Hemmwerte wurde die bei der Bestimmung der Aethanol- und Acetonhemmung angegebene Gleichung herangezogen.

Jede Hemmwertreihe wurde drei- oder viermal bestimmt und aus den Parallelwerten der Mittelwert berechnet. Stark abweichende Einzelwerte wurden nicht in Berechnung der Mittelwerte einbezogen. Den Bestimmungen der Hemmwertreihen gingen Versuche voraus, die die ungefähre Lage des Hemmbereiches aufzeigen sollten. Die dabei erhaltenen Einzelwerte wurden nicht zur Berechnung der Mittelwerte herangezogen.

Darstellung der Standardkurven

Werden die prozentualen Hemmwerte gegen die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen, so entstehen Kurven mit sigmoidem Verlauf, die in ihrem oberen Teil sehr langgestreckt sind und den aus der Pharmakologie bekannten Dosis-Wirkungskurven gleichen. G i a n g und H a l l (110), auf welche die Verwendung der Cholinesterasehemmung zum Nachweis von Insektiziden zurückgeht, tragen den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration gegen die lineare prozentuale Hemmung auf und legen durch die vor allem im oberen Hemmbereich zusammengedrängten Kurvenpunkte eine Gerade. Gegen diese Art der Darstellung wendet sich G a g e (124), der in Anlehnung an G o l d s t e i n (126) die Restaktivität a , die den Quotienten aus der zu Beginn der Reaktion vorhandenen Enzymkonzentration E_0 und der nach der Zeit t noch vorhandenen nicht blockierten Enzymkonzentration E_f entspricht, durch die Gleichung

$$a = e^{-K_3 It} \quad (1)$$

oder

$$\ln a = -K_3 It \quad (2)$$

wiedergibt. Den Faktor K_3 erhält G a g e aus der Formel



K_3 stellt eine Konstante dar, die die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor wiedergibt. Durch Umformen der Gleichung 1 erhält man

$$\log a = \log e (-K_3 It) \quad (3)$$

oder

$$\log a = -K_4 It \quad (4)$$

Bei einer definierten Inkubationszeit ist t konstant und die Inhibitorkonzentration proportional dem dekadischen Logarithmus der Restaktivität a . Daraus folgert G a g e, daß bei der Darstellung der Inhibitorkonzentration gegen den Logarithmus der Restaktivität Standardkurven mit geradlinigem Verlauf erhalten werden.

Ein Teil der eigenen Ergebnisse, die nach der von G a g e geforderten Art dargestellt wurden (Abb. 10 bis 12) zeigen, daß auch dann kein absolut geradliniger Kurvenverlauf vorliegt. G a g e selbst veröffentlichte eine nach der von ihm geforderten Art dargestellte Standardkurve von 0,0 Diäethyl-O-2,4Dichlorphenylphosphorthionat, die auf Versuchsergebnissen von B o y d (127) beruht und nur im Bereich höherer Restaktivität geradlinig verläuft. G a g e führt die Abweichung auf die Meßmethode zurück, die die tatsächliche enzymatische Aktivität nicht richtig wiedergeben soll.

Wenn man berücksichtigt, daß die Hemmwerte nicht sehr exakt reproduzierbar sind, bei eigenen Versuchen traten Abweichungen bis $\pm 6,0\%$ auf, erscheint die von G i a n g und H a l l gewählte Darstellungsart für den Hemmwertbereich

Abb. 10

Standardkurve

v. Parathion

(n. G a g e)

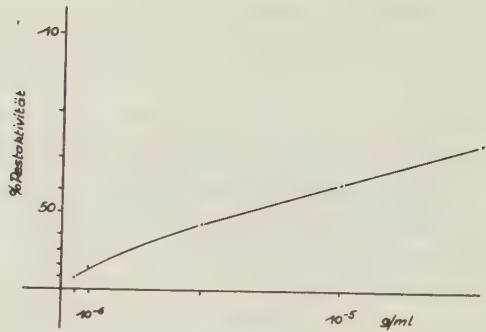


Abb. 11

Standardkurve

v. Delnav

(n. G a g e)

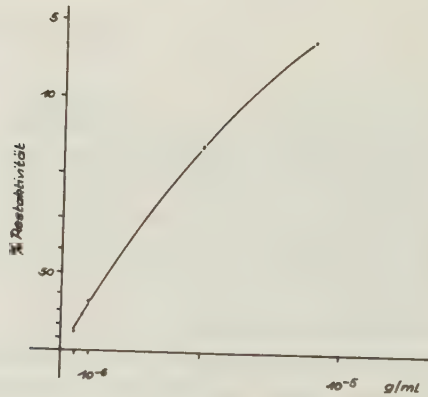
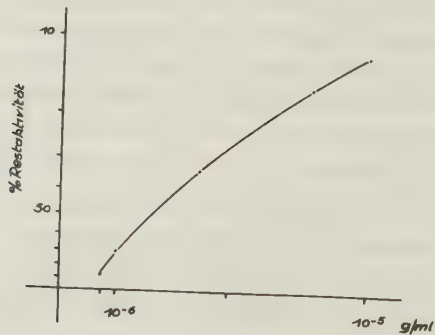


Abb. 12

Standardkurve

v. Dipterex

(n. G a g e)



von 20 bis 80 % durchaus geeignet zu sein. Dem pflichtet auch G a g e insofern bei, als er einräumt, daß der bei den Versuchen auftretende Fehler im mittleren Hemmwertbereich kaum eine Abweichung von einem linearen Verlauf erkennen lasse.

Diese Art der Darstellung ist vor allem dann angebracht, wenn die Standardkurven beim Nachweis von Insektiziden Verwendung finden sollen. Wegen der beträchtlichen Schwankungen der Hemmwerte unterhalb von 20 % und der relativen Unempfindlichkeit oberhalb 75 bis 80 % müssen zur Bestimmung unbekannter Wirkstoffkonzentrationen Hemmwerte im Bereich von 20 bis 80 % herangezogen werden. Bei der Darstellung nach G a g e werden die prozentualen Restaktivitäten oberhalb etwa 50 % stark zusammengedrängt, so daß die zugehörigen Inhibitorkonzentrationen nur mit geringerer relativer Genauigkeit entnommen werden können.

Die graphische Darstellung der bei den eigenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse erfolgte in Anlehnung an G i a n g und H a l l . Die auf der Abszisse logarithmisch aufgetragenen Wirkstoffkonzentrationen bedeuten Gramm Wirkstoff pro Milliliter Reaktionslösung. Der Kurvenverlauf wurde in dem Bereich von 20 bis 80 % Hemmung, entsprechend der Lage der Kurvenpunkte, weitgehend linear dargestellt.

Die dem Hemmbereich von 20 bis 80 % entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen reichen bei fast allen untersuchten Wirkstoffen über annähernd eineinhalb Zehnerpotenzen (Abb. 17 bis 28, Anhang Seite 89 bis 92). Eine Ausnahme bildet Phosdrin (Abb. 20), bei dem dieser Konzentrationsbereich weniger als eine Zehnerpotenz umfaßt. Am Beispiel des Phosdrins wird zugleich deutlich, daß vier Kurvenpunkte zur exakten Wiedergabe des Kurvenverlaufes nicht ausreichen.

Zur Definition der spezifischen Inhibitoraktivität wird die I_{50} -Konzentration, das bedeutet diejenige Konzentration, die eine 50%ige Hemmung verursacht, herangezogen. Die I_{50} -Konzentrationen variieren mit der Enzymkonzentration, der Dauer der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur (124). In Tabelle 3 sind die bei den eigenen Versuchen erhaltenen I_{50} -Konzentrationen aufgeführt. Sie wurden aus den Standardkurven graphisch ermittelt.

Tab. 3 I₅₀-Konzentrationen

Wirkstoff	Konzentration (g/ml)
Chlorthion	$1,6 \times 10^{-5}$
Delnav	$1,7 \times 10^{-6}$
Diazinon	$1,9 \times 10^{-8}$
Dipterex	$2,2 \times 10^{-6}$
Ethion	$5,2 \times 10^{-6}$
Gusathion	$6,8 \times 10^{-7}$
Lebaycid	$1,1 \times 10^{-6}$
Malathion	$3,2 \times 10^{-6}$
Metasystox	$1,4 \times 10^{-7}$
Parathion	$6,3 \times 10^{-6}$
Phosdrin	$7,6 \times 10^{-9}$
Phosphamidon	$6,6 \times 10^{-7}$

5. Oxydation mit Brom

Wie von G i a n g und H a l l (110) bei Parathion sowie von D i g g l e und G a g e (19) gezeigt wurde, können Ester der Thio- und Dithiophosphorsäure, die oft nur eine schwache in vitro-Hemmwirkung aufweisen, durch Oxydation in potente Inhibitoren umgewandelt werden. G i a n g und H a l l verwendeten dazu rauchende Salpetersäure. Leichter erfolgt, wie F a l l s c h e e r und C o o k (128) zeigten, die Oxydation mit Brom oder Bromsuccinimid in wäßriger Lösung. Die Autoren beobachteten nur bei der Verwendung von Bromsuccinimid, nicht jedoch bei Brom eine Aktivitätsminderung des Enzympräparates einer ungereinigten Serumcholinesterase. Demgegenüber stellten Y i p und C o o k (129) fest, daß die Aktivität von gereinigter Rindererythrozytencholinesterase auch durch Brom herabgesetzt wird, und zwar in größerem Umfange als bei ungereinigter Serumcholinesterase. Die Erklärung hierfür sehen sie darin, daß die Verunreinigungen des Serumcholinesterasepräparates in der Lage sind, Brom zu adsorbieren und so die auf das Enzym einwirkende Bromkonzentration herabzusetzen, wogegen die Rindererythrozytenesterase dem vollen Effekt der Bromwirkung ausgesetzt ist. Es wurde daher zunächst die Aktivitätsminderung durch Brom und Bromsuccinimid, die auf Grund der Angaben von F a l l s c h e e r und C o o k als Oxydationsmittel vorgesehen waren, bestimmt.

Bestimmung der Aktivitätsminderung durch Brom und Bromsuccinimid

In der gleichen Weise wie bei den vorausgegangenen Versuchen wurden die prozentualen Hemmwerte von verschiedenen Konzentrationsstufen einer wäßrigen Bromsuccinimidlösung und einer gesättigten wäßrigen Bromlösung bestimmt. Die Konzentrationen

der Bromsuccinimidlösung betragen 10^{-5} , 8×10^{-6} , 5×10^{-6} , 2×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} und 10^{-7} g/ml Reaktionslösung, die der gesättigten Bromlösung 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} und 10^{-5} ml/ml Reaktionslösung. Nach Hollemann-Wiberg liegt der Bromgehalt einer gesättigten wäßrigen Bromlösung bei 3,55 %, so daß den Volumenkonzentrationen Gewichtskonzentrationen von $3,55 \times 10^{-5}$, $1,78 \times 10^{-5}$, $3,55 \times 10^{-6}$, $1,78 \times 10^{-6}$ und $3,55 \times 10^{-7}$ g/ml entsprechen. Die graphische Darstellung der beiden Hemmwertreihen (Abb. 13) zeigt, daß die Inhibitorwirkung von Bromsuccinimid gegenüber dem Enzympräparat rund fünf- bis zehnmal größer ist als diejenige von Brom, weshalb Brom als Oxydationsmittel vorzuziehen ist. Es ist weiter zu erkennen, daß eine Bromkonzentration von 10^{-6} g/ml praktisch keine Beeinträchtigung der Aktivität mehr zur Folge hat, was eine maximale Restkonzentration von 10^{-6} bis $1,5 \times 10^{-6}$ g Brom pro ml Reaktionslösung erlaubt.

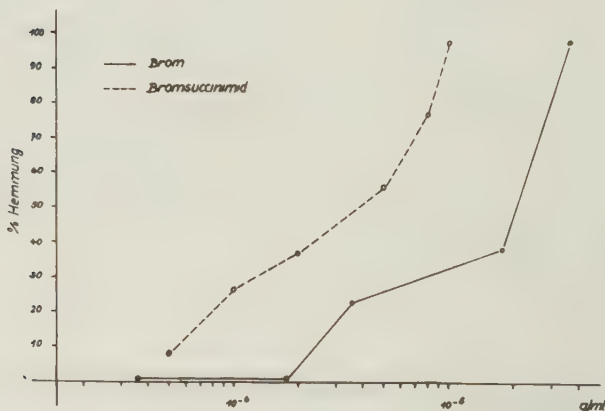


Abb. 13 Hemmwertkurven von Brom und Bromsuccinimid

Bestimmung der relativen Hemmwerte

Für die Versuche wurden Diazinon, Parathion, Gusathion, Malathion, Metasystox, Chlorthion und Lebaycid ausgewählt. Zur Oxydation wurden je 10 ml der Standardlösungen mit einem Wirkstoffgehalt von 10^{-2} g/ml in einen 100 ml fassenden Meßkolben pipettiert und auf etwa 50 ml verdünnt. Diese Lösung wurde tropfenweise mit gesättigter Bromlösung versetzt, bis eine gerade wahrnehmbare Gelbfärbung auftrat, die mindestens 5 min bestehen blieb. Diese Lösung wurde auf 100 ml ergänzt und danach auf die erforderlichen Konzentrationen verdünnt. Die Bestimmung der Hemmwerte erfolgte in der gleichen Art wie bei den nichtoxydierten Wirkstoffen.

Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der I_{50} -Dosen der oxydierten und nichtoxydierten Wirkstoffe (Tab. 4) zeigt, daß nur bei Chlorthion, Gusathion, Malathion und Parathion eine deutliche Erhöhung der Inhibitorwirkung erfolgte.

Tab. 4 I_{50} -Konzentrationen oxydierter und nichtoxydierter Wirkstoffe

Wirkstoff	I_{50} -Konzentrationen (g/ml)		Wirkungs- steigerung
	oxydiert	nichtoxydiert	
Chlorthion	$2,5 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-5}$	640
Diazinon	$2,8 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-8}$	-
Gusathion	$5,0 \times 10^{-9}$	$6,8 \times 10^{-7}$	140
Lebaycid	10^{-6}	$1,1 \times 10^{-6}$	1,1
Malathion	$3,5 \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-6}$	91
Metasystox	$8,2 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-7}$	1,7
Parathion	$6,2 \times 10^{-9}$	$6,2 \times 10^{-6}$	1000

Bei Lebaycid und Metasystox ist praktisch keine Erhöhung festzustellen, während bei Diazinon ein Wirkungsabfall zu beobachten ist.

Die Ergebnisse zeigen nur eine teilweise Übereinstimmung mit den von F a l l s c h e e r und C o o k (128) veröffentlichten Daten, die bei Parathion je nach Reinheitsgrad des Präparates eine Wirkungssteigerung um das 100- bis 9000-fache, bei Malathion um das 150- bis 375fache und bei Chlorthion um das 125- bis 395fache feststellten.

Eine Erklärung für die mangelnde Übereinstimmung ist darin zu sehen, daß die bei den eigenen Versuchen verwendeten Wirkstoffpräparate technische Produkte darstellen, die nicht unbedingt mit denen der beiden Autoren identisch sind. Daß die Inhibitorwirkung von Wirkstoffen mit unterschiedlichem Reinheitsgrad beträchtlich schwanken kann, geht aus den Untersuchungen von F a l l s c h e e r und C o o k selbst hervor. So liegt die I_{50} -Dosis eines gereinigten Parathionpräparates bei der von ihnen angewendeten Methode bei 64 % gegenüber 0,8% bei einem technischen Produkt.

Soll die Oxydation von Estern der Thio- und Dithiophosphorsäure im Rahmen der enzymatischen Analyse Anwendung finden, muß die Oxydation so vorgenommen werden, daß sie nicht über die Oxonform, die die größte Inhibitorwirkung aufweist, hinausführt. Es bleibt fraglich, ob dies mit einer einzigen, bei allen derartigen Insektiziden anwendbaren Methode möglich ist.

6. Die Anwendung der Nachweismethode zur Bestimmung von Rückständen

Versuchsanordnung und Ergebnisse

In der Rückstandsanalytik wird der Wert einer analytischen Methode weitgehend von der Empfindlichkeit gegenüber den bei der Aufarbeitung der Proben mitextrahierten Pflanzenstoffen bestimmt. Eine große Empfindlichkeit verlangt einen komplizierteren, langwierigeren Aufarbeitungsprozeß, womit häufig eine geringere Analysenausbeute verbunden ist. Die relative Unempfindlichkeit biologischer und biochemischer Nachweismethoden erlaubt daher einfachere Cleanup-Verfahren, die besonders der Anwendung in der Lebensmittelkontrolle entgegenkommen.

Die folgenden Versuche sollten die Anwendungsmöglichkeit der bisher nur an Reinsubstanzen erprobten Methode zum Nachweis von Rückständen unter Verwendung einer einfachen Aufarbeitungsmethode demonstrieren. Als Modellsubstanz diente Parathion, als Pflanzenmaterial Kopfsalat.

200 g Salat wurden mit 300 ml Methylenchlorid im Starmix 5 min lang mazeriert. Wenn sich dabei eine Emulsion bildete, wurde sie durch Zentrifugieren getrennt. Die Methylenchloridphase wurde in einem Scheidetrichter abgetrennt und der Rückstand viermal mit 100, 50, 50, 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die vereinigten Methylenchloridauszüge wurden über 100 g wasserfreies Natriumsulfat filtriert und dieses mit 100 ml Methylenchlorid nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde in der auf Abbildung 14 dargestellten Apparatur unter Vakuum abgedampft, wobei eine Temperatur von etwa 30°C eingehalten wurde. Der stark chlorophyllhaltige Rückstand, der sich in dem Ansatzstück des Birnenkolbens ansammelte, wurde in 3 ml Aethanol gelöst und unter zweimaligem Nachspülen mit je 1 ml Aethanol in einen 250 ml fassenden Meßkolben übergeführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Tween 80 wurde bis zur Marke aufgefüllt. Zur Bestimmung der prozentualen Hemmung wurden pro Ansatz

1 ml der Analysenlösung benutzt. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde zur ungehemmten Vergleichsprobe und zur Vergleichslösung für die colorimetrische Messung vor dem Auffüllen auf 25 ml je 1 ml der Analysenlösung zugesetzt.

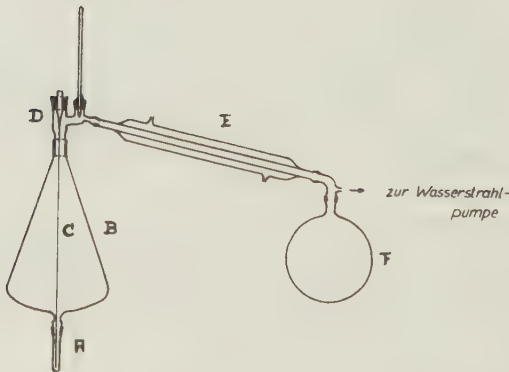


Abb. 14

Apparatur zur Einengung von Pflanzenextrakten unter Vakuum

A Ansatzstück zur Aufnahme des Verdampfungsrückstandes, B Birnenkolben (1l) zur Aufnahme des Pflanzenextraktes, C Siedekapillare, D Claisen-Aufsatz mit Thermometer, E Liebig-Kühler, F Rundkolben (1l) zur Aufnahme der kondensierten Lösungsmittel

Insgesamt wurden je sieben Bestimmungen mit und ohne Parathionzusatz durchgeführt. Der Wirkstoff wurde in Form einer acetonigen Lösung in den laufenden Starmix gegeben. Die Wirkstoffmenge betrug pro Bestimmung 4000 γ entsprechend

20 ppm bezogen auf das Pflanzenmaterial.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 5 aufgeführt. Zur Berechnung wurde von den prozentualen Hemmwerten der Analysenansätze der durchschnittliche Hemmwert aller wirkstofffreien Vergleichsproben abgezogen. Aus der Standardkurve für Parathion (Abb. 22) wurden die den Differenzwerten entsprechenden Parathionmengen entnommen. Diese Wirkstoffmengen beziehen sich auf 1 ml der Reaktionslösung. Um den Wirkstoffgehalt der Analysenlösung und damit der aufgearbeiteten Probe zu erhalten, sind sie mit 2500 zu multiplizieren.

Tab. 5 Analysenergebnisse von Modellversuchen mit Parathion zur Bestimmung der analytischen Genauigkeit

I	II	III	IV	V	VI	VII
29,0	12,2	11,8	17,2	1,12	2800	70,2
30,1	13,9	11,8	18,3	1,25	3130	78,2
32,1	14,7	11,8	20,3	1,42	3600	90,0
31,8	12,1	11,8	20,0	1,37	3430	85,6
28,9	7,9	11,8	17,1	1,10	2750	68,7
28,5	16,0	11,8	16,7	1,06	2650	66,2
34,9	5,8	11,8	23,1	1,67	4180	104,2

- I Hemmung der Analysenansätze (in %)
- II Hemmung der wirkstofffreien Vergleichsproben (in %)
- III durchschnittliche Hemmung der wirkstofffreien Vergleichsproben (in %)
- IV Differenz zwischen Analysenhemmwerten und durchschnittlichem Hemmwert der wirkstofffreien Vergleichsproben (in %)
- V Wirkstoffgehalte der Reaktionslösungen (in μ /ml)
- VI Wirkstoffgehalte der Proben (in μ)
- VII Prozentanteil der nachgewiesenen Wirkstoffmengen an den Ausgangsmengen von je 4000 μ Parathion

Im Durchschnitt wurden bei den sieben Einzelbestimmungen 80,4 % der eingesetzten Parathionmengen nachgewiesen. Die Blindwerte dürften hauptsächlich durch den zur Lösung des Extraktionsrückstandes verwendeten Äthylalkohol bedingt sein. Der Hemmwert der in der Reaktionslösung vorliegenden Äthanolkonzentration von 2×10^{-3} ml/ml liegt zwischen 8 und 10 % (s. Abb. 9). Die Erfassungsgrenze der Methode ist primär durch diejenige Wirkstoffkonzentration der Reaktionslösung gegeben, die eine etwa 15- bis 20%ige Hemmung bewirkt. Bei Parathion liegt diese Grenze zwischen 9×10^{-7} und $1,5 \times 10^{-6}$ g/ml. Dies bedeutet im Falle von Parathion, daß bei 500 g Probenmaterial an Stelle der eingesetzten 200 g die Erfassungsgrenze bei 8 ppm und bei 1000 g Probenmaterial bei 4 ppm liegt. Daneben erscheint es möglich, an Stelle von 5 ml Äthanol 2 ml zum Lösen des Extraktionsrückstandes zu verwenden. Die Analysenlösung braucht dann nur 100 ml statt 250 ml zu betragen, wodurch der Wirkstoffgehalt der Lösung um das 2,5fache ansteigt und die Erfassungsgrenze auf rund 1 bis 1,5 ppm herabgesetzt wird.

Aufarbeitungsgang und Analysengenauigkeit

Die Bedeutung des Aufarbeitungsganges für die Genauigkeit der Analysenmethode wird deutlich, wenn man die Standardabweichung der Analysenergebnisse aus Tabelle 5 mit der Standardabweichung der Hemmwerte für die Parathionstandardkurve vergleicht.

Die Standardabweichung stellt eine statistische Kennziffer zur Charakterisierung der Genauigkeit von Meßwerten dar (130). D o e r f f e l (131) gibt zu ihrer Berechnung die Gleichung

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (1)$$

an, wobei x_i die gemessenen Einzelwerte und N die Zahl aller Messungen bedeuten. Soll die Standardabweichung aus Einzelwerten von Proben mit verschiedenem Gehalt berechnet werden, so lautet die Gleichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2 + (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \dots + (x_i - \bar{x}_i)^2}{N - M}} \quad (2)$$

M bedeutet die Anzahl der Proben oder Gruppen, N die Anzahl der Einzelmessungen. Variieren die Mittelwerte der Gruppen stärker, so sind nach K a i s e r und S p e c k e r (130) die Einzelabweichungen vor der Quadrierung in die relativen Abweichungen

$$\frac{x_i - \bar{x}_i}{\bar{x}} \quad \text{oder} \quad \frac{(x_i - \bar{x}_i) \times 100}{\bar{x}} \quad \text{umzurechnen. In Tabelle 6}$$

ist die nach dieser Methode vorgenommene Berechnung der Standardabweichung für die Parathionhemmwerte dargestellt.

Die beiden Werte der Konzentrationsstufe 5×10^{-7} g/ml wurden nicht in die Berechnung einbezogen, da die Zahl der Einzelwerte in den Gruppen gleich groß sein muß (131).

Tab. 6 Standardabweichung der Hemmwerte von Parathion

Konz. (g/ml)	x_i	$\bar{x}_i$	$(x_i - \bar{x}_i)$	$\frac{(x_i - \bar{x}_i) \cdot 100}{\bar{x}_i}$	$\left[\frac{(x_i - \bar{x}_i) \cdot 100}{\bar{x}_i} \right]^2$
5×10^{-7}	10,9	-	-	-	-
	9,2				
10^{-6}	19,6	16,9	2,7	16,0	256,0
	16,5		0,4	2,4	5,8
	14,6		2,3	13,6	185,0
5×10^{-6}	45,7	43,8	1,9	4,3	18,5
	43,5		0,3	0,7	0,5
	42,2		1,6	3,7	13,7
10^{-5}	60,3	60,9	0,6	1,0	1,0
	60,3		0,6	1,0	1,0
	62,0		1,1	1,8	3,2
$1,5 \times 10^{-5}$	76,1	73,0	3,1	4,2	17,6
	71,7		1,3	1,8	3,2
	71,3		1,7	2,3	5,3

$$\Sigma = 510,8$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{510,8}{12-4}} = \pm \sqrt{63,8} = \pm 8,0$$

Die Standardabweichung der in Tabelle 5 aufgeführten Versuchsergebnisse wurde nach der Formel 1 berechnet. An Stelle der absoluten Einzelabweichung $x_i - \bar{x}_i$ wurde die relative

Einzelabweichung $\frac{(x_i - \bar{x}_i) \cdot 100}{\bar{x}_i}$ der Berechnung zugrunde gelegt.

Tab. 7 Standardabweichung der Ergebnisse aus Tabelle 5

x_i	$\bar{x}_i$	$(x_i - \bar{x}_i)$	$\frac{(x_i - \bar{x}_i) \times 100}{\bar{x}_i}$	$\left[\frac{(x_i - \bar{x}_i) \times 100}{\bar{x}_i} \right]^2$
70,0	80,4	10,4	12,9	166,4
78,2		2,2	2,7	7,3
90,0		9,6	11,9	141,6
85,6		5,2	6,5	42,3
68,7		11,7	14,6	213,4
66,2		14,2	17,6	309,8
104,2		23,8	29,6	876,2

$$\sum = 1757,0$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{1757}{7-1}} = \pm \sqrt{292,8} = \pm 17,1$$

Die Differenz zwischen der theoretischen Ausbeute von 100 % und der tatsächlichen Ausbeute von durchschnittlich 80,4 % muß auf die unzureichende Extraktion des Analysenmaterials zurückgeführt werden und ist als systematischer Fehler zu betrachten.

Der Vergleich der beiden Standardabweichungen von $\pm 8,0$ und $\pm 17,1$ macht deutlich, daß selbst ein einfacher Aufarbeitungsgang die Genauigkeit der Nachweismethode stark beeinflußt. Eine exaktere Betrachtung dieser Tatsachen verlangt jedoch ein größeres Zahlenmaterial aus vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Nachweis- und Cleanup-Verfahren.

7. Papierchromatographische Versuche

Es wurde bereits daraufhingewiesen, daß zur Lokalisierung papierchromatographisch aufgetrennter organischer Phosphorsäureester die Cholinesterasehemmung herangezogen werden kann. Das Prinzip dieser Verfahren besteht darin, daß eine gleichmäßig auf das Chromatogramm aufgebrachte Cholinesteraselösung an den wirkstoffhaltigen Stellen blockiert wird und eine Hydrolyse nur an den wirkstofffreien Stellen erfolgen kann. Bei Verwendung geeigneter Substratverbindungen kann ein Farbkontrast erzeugt werden, der die Lage der Wirkstoffflecke andeutet. Die ersten Versuche dieser Art wurden von C o o k (132) durchgeführt, der als Substrat Acetylcholin benutzte und versuchte, die gebildete Essigsäure über die pH-Änderung mit Bromthymolblau nachzuweisen, ohne jedoch befriedigende Ergebnisse zu erzielen. Bei Nachweisversuchen mit der Stärkegel-Elektrophorese verwendeten T h o m p s o n und C o o k (133) α -Naphthylacetat, dessen Spaltprodukt, α -Naphthol, durch Kupplung mit Echtblau-Bsalz sichtbar gemacht wurde. Das gleiche Prinzip wendeten M c K i n l e y und R e a d (134) bei papierchromatographischen Versuchen an. Die Chromatogramme wurden 30 min mit dem aufgesprühten Enzympräparat, einem Leberhomogenat, inkubiert und danach mit einer Mischung aus Substratlösung und Farbreagens behandelt. Vor dem Auftragen des Enzympräparates wurden die Chromatogramme zur Oxydation der Wirkstoffe Bromdämpfen ausgesetzt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines zweiphasigen Systems, wobei als stationäre Phase das mit Mineralöl imprägnierte Chromatogrammpapier diente. Daneben wurden noch Versuche mit acetyliertem Papier durchgeführt. Als untere Nachweisgrenze geben M c K i n l e y und R e a d 5 μ für eine Reihe organischer Phosphorsäureester, darunter Ethion, Parathion und Methylparathion an. Bei Verwendung von acetyliertem Papier liegt diese Grenze bei 0,5 μ . Das Ziel der eigenen Versuche war, festzustellen, wie weit diese Arbeitsweise zum Nachweis organischer Phosphorsäureester in Pflanzenmaterial geeignet ist.

Herstellung eines Enzympräparates

Nach einer Vorschrift von T a u b e r (135) wurde aus Schweinehirn ein Cholinesterasepräparat hergestellt. Das Präparat wurde dann nach einem Verfahren von O r d und T h o m p s o n (136) gereinigt und angereichert.

450 g gefrorenes Schweinehirn wurden mit 150 g Seesand zu einer Paste verrieben und mit 250 ml 0,05 M Acetatpuffer von pH 5,4 verrührt. Nach Zugabe von 15 ml Toluol wurde das Gemisch 24 Stunden bei 37°C autolysiert. Der Gewebebrei wurde abfiltriert, der Filtrerrückstand in einer wassergekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Die vereinigten Extraktlösungen wurden auf ein pH von 4,5 eingestellt und der dabei entstehende Niederschlag abfiltriert. Die verbleibende Lösung wurde auf pH = 8,0 eingestellt und mit festem Ammonsulfat auf eine 24%ige Sättigung gebracht. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit weiterem Ammonsulfat auf 50 % Sättigung gebracht. Die entstandene Ausflockung wurde zentrifugiert, wobei sie sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit ansammelte. Die Abscheidung wurde in 50 ml Phosphatpuffer gelöst und in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

Versuchsanordnung

Der Chromatogrammbogen wird mit einer Lösung aus einem Teil der Enzymlösung und vier Teilen Phosphatpuffer imprägniert und auf eine Glasplatte von 36 x 26 cm aufgelegt. Im Kaltluftstrom wird die überschüssige Flüssigkeit entfernt. Anschließend wird das mit einer zweiten Glasplatte abgedeckte Chromatogramm in eine Entwicklerschale von 37 x 28 cm auf ein Glasgestell aufgelegt (Abb. 15). Die Schale, die etwa 20 bis 30 ml Wasser enthält, wird mit einer Glasplatte abgedeckt und in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 40°C gestellt. Nach dreißigminütiger Inkubationszeit wird auf den Chromatogrammbogen ein zweiter gleich großer Filtrierpapier-

bogen, der mit einer 2×10^{-4} molaren Substratlösung getränkt und nach Verdampfen des Lösungsmittels mit Pufferlösung schwach angefeuchtet wird, fest aufgelegt. Nach einer Hydrolysenzeit von 1 1/2 bis 2 Stunden werden die Bögen getrocknet und mit der üblichen Reagenslösung aus 5%iger Natriumlaurylsulfatlösung und 1%iger Echtblau-B-salz-Lösung im Verhältnis 5 : 2 besprüht. Dabei werden die wirkstofffreien Stellen rotviolett angefärbt, während die Stellen, an denen sich die Wirkstoffe befinden, blaßgelb erscheinen. Die Farbe verändert sich meistens innerhalb der ersten 15 min von rotviolett nach blau, wodurch gleichzeitig der Farbkontrast zwischen den gefärbten und ungefärbten Stellen abgeschwächt wird.

Ergebnisse

Es zeigte sich, daß im Verlauf der enzymatischen Reaktion die Insektizidflecke teilweise auseinanderfließen, wodurch vor allem die scharfe Abgrenzung gegen die Umgebung verlorenght. Diese Erscheinung läßt sich zum Teil vermeiden, wenn der Feuchtigkeitsgehalt von Chromatogramm- und Substratbogen möglichst niedrig gehalten wird.

Bei Versuchen, mit Hilfe organischer Fließmittel (64) eine Reihe von Insektiziden (Parathion, Dipterex, Gusathion, Metasystox, Chlorthion, Lebaycid) aufzutrennen, wurden nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Die Substanzen wandern mit oder unmittelbar hinter der Fließmittelfront. Die Verwendung zweiphasiger Fließmittelsysteme, wie sie von M c K i n l e y und R e a d (134) sowie anderen (65, 60) beschrieben werden, ist nicht möglich. Bei Vorversuchen hat sich gezeigt, daß das mit der lipophilen Phase (4%ige Glycerin-Aetherlösung) behandelte Papier fast keine Enzymlösung aufnimmt. Ebenso verhält sich acetyliertes Papier. Es war somit nicht möglich, das von M c K i n l e y und R e a d angegebene Verfahren unter Verwendung eines in wäßriger Lösung vorliegenden Enzympräparates experimentell zu bestätigen.

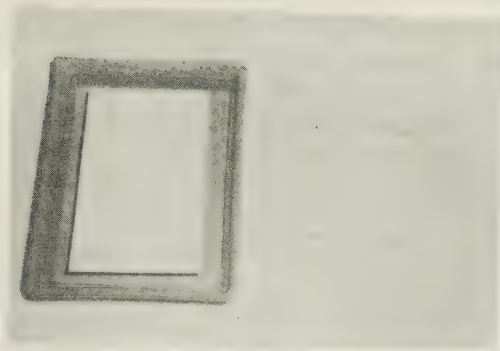


Abb. 15 Entwicklerschale (aufgedeckt) mit
 eingelegtem Chromatogramm.

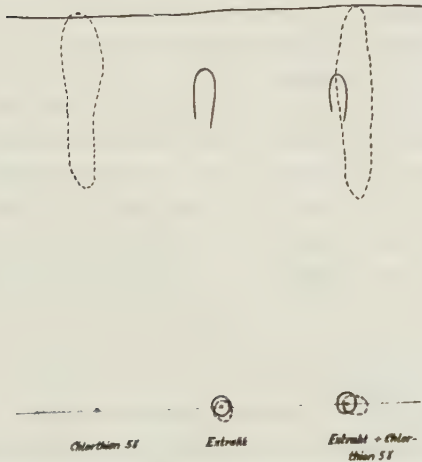


Abb. 16 Trennung von Chlorthion und Pflanzenextrakt
 (Erläuterungen im Text S. 74)

Dagegen ist es möglich, mit einem von N i e s s e n , T i e t z und F r e h s e (137) für Arbeiten mit acetyliertem Papier angegebenen Fließmittel eine Trennung von pflanzlichen Begleitstoffen und einer Reihe von organischen Phosphorsäureestern durchzuführen. Bei Modellversuchen wurden auf der Startlinie in Abständen von 5 cm 5 $\times$ des in Aceton gelösten Wirkstoffes, 0,2 ml eines mit Methylenchlorid hergestellten Salatextraktes sowie Salatextrakt und Wirkstoff aufgetragen. Die Chromatogramme werden absteigend auf 18 x 35 cm großen Bogen entwickelt. Die Laufstrecke beträgt 20 bis 25 cm, die Laufzeit bei Raumtemperatur ca. 5 Stunden. Das aus Aceton, Acetonitril und Wasser im Verhältnis 1 : 1 : 3 bestehende Fließmittel läßt die pflanzlichen Extraktstoffe weitgehend am Startpunkt zurück. Möglicherweise mitwandernde Extraktstoffe zeigen praktisch keine Einwirkung auf die Cholinesterase. Vor der enzymatischen Behandlung werden die noch feuchten Chromatogramme zur Oxydation der Wirkstoffe eine Minute lang der Einwirkung von Bromdämpfen ausgesetzt. Auf Abbildung 16 ist ein auf diese Art erhaltenes Chromatogramm wiedergegeben, bei dem als Wirkstoff Chlorthion aufgetragen wurde. Die Stellen, an denen sich Extraktstoffe befinden, sind mit durchgehenden Linien umrandet. Sie werden wie die wirkstofffreien Zonen rotviolett angefärbt. Die mit gestrichelten Linien abgegrenzten Flächen stellen die Wirkstoffflecke dar. Sie sind auf dem Original schwach gelb gefärbt. In gleicher Weise wurden Chromatogramme mit Gusathion, Dipterex, Lebaycid erhalten. Weniger befriedigend waren die Ergebnisse bei Parathion und Metasystox.

Die Nachweisgrenze dürfte bei dieser Arbeitsweise je nach Art des Wirkstoffes zwischen 2 und 5 $\times$ liegen. Eine quantitative Auswertung erscheint möglich durch Ausschneiden der den Wirkstoffen entsprechenden Zonen, durch ihre Naßveraschung und Bestimmung des Gesamtphosphors, wobei jedoch ein phosphatfreier Puffer erforderlich wäre.

III. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten des quantitativen und qualitativen Nachweises organischer Phosphorverbindungen an Hand der Cholinesterasehemmung verfolgt. Als Substratverbindung fand α -Naphthylacetat Verwendung. Die enzymatische Aktivität wurde auf colorimetrischem Weg über das bei der Hydrolyse entstehende α -Naphthol, welches mit Echtblau-B-salz in eine Farbverbindung übergeführt wurde, bestimmt. Dem experimentellen Teil der Arbeit ist ein kurzer Abriß über allgemeine Fragen der Rückstandsanalytik und ein Überblick über Struktur und Wirkungsweise der Cholinesterase sowie über die bei der Rückstandsanalytik angewandten Methoden zur Aktivitätsbestimmung vorangestellt.

1. Es wurden die Lage der Extinktionsmaxima und die Beständigkeit der Farbverbindungen von α - und β -Naphthol mit Echtblau-B-salz bestimmt. Es zeigte sich, daß bei einem pH-Wert von 7,2 die Extinktionsmaxima der α - und β -Naphtholfarbverbindung bei 600 beziehungsweise 555 nm liegen. Die Intensität der beiden Farbverbindungen bleibt bei der Aufbewahrung der Farblösungen im Dunkeln in der Zeit von 20 bis 45 min praktisch konstant. Die Messung der Extinktionswerte kann innerhalb dieser Zeitspanne mit einem Photometer vom Typ des Elko II-Gerätes unter Verwendung der Filter S 59 und S 55 erfolgen.
2. Als Enzympräparat mit definiertem Gehalt wird die von der Firma Winthrop-Stearns (USA) als Trockenpräparat angebotene gereinigte Rindererythrozytenacetylcholinesterase empfohlen. Da das α -Naphthylacetat durch Cholinesterase leichter gespalten wird als das β -Naphthylacetat, ist es als Substratverbindung vorzuziehen. Die Herstellung und das Aufbewahren der Stamm- und Gebrauchslösungen wurde beschrieben.
3. Zur Festsetzung geeigneter Reaktionsbedingungen wurde der Einfluß der Enzym- und Substratkonzentration sowie der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit auf den Reaktions -

ablauf untersucht. Das angestrebte Ziel war, diese Faktoren für ein 10 ml betragendes Reaktionsvolumen so zu wählen, daß der dem im Verlauf der Reaktion gebildeten α -Naphthol entsprechende Extinktionswert der auf 25 ml verdünnten Reaktionslösung für die unter Punkt 1 aufgeführten Meßbedingungen für eine Schichtdicke von 1,000 cm etwa bei 1,000 liegt. Die Versuche zeigten, daß hierzu eine Enzymkonzentration von 1,5 I.E./ml und eine 8×10^{-5} molare Substratkonzentration bei einer Reaktionstemperatur von 40°C und einer Reaktionsdauer von 30 min am besten geeignet sind.

4. Für eine Reihe organischer Phosphorverbindungen wurden Standardhemmwertkurven festgelegt. Bei der Darstellung der Kurven erscheint es zweckmäßig, die prozentualen Hemmwerte linear gegen die dekadischen Logarithmen der Wirkstoffkonzentrationen aufzutragen. Die Herstellung wäßriger, für diese Versuche geeigneter Wirkstofflösungen wurde so vorgenommen, daß jeweils 100 mg Substanz in 5 ml unvergälltem Aethanol gelöst und unter Verwendung eines Lösungsvermittlers in eine wäßrige Suspension übergeführt wurden. Versuche zeigten, daß eine Restkonzentration von 5×10^{-4} ml Aethanol in 1 ml Reaktionslösung toleriert werden kann.
5. Bei einer Reihe von Estern der Thio- und Dithiophosphorsäure konnte durch die Oxydation zu ihren Sauerstoffanalogen eine Steigerung der Inhibitorwirkung erreicht werden. Die Hemmung der Aktivität der Acetylcholinesterase durch die als Oxydationsmittel in Frage kommenden Brom und Bromsuccinimid wurde quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, daß der Aktivitätsverlust durch Brom geringer ist als durch Bromsuccinimid.
6. An Hand von Modellversuchen mit Parathion wurde die Anwendungsmöglichkeit der Methode zum Nachweis von Insektiziden in pflanzlichem Material demonstriert. Eine einfache Methode zur Extraktion der Wirkstoffe aus dem Probenmaterial wurde beschrieben. Im Durchschnitt konnten 80,4 % der eingesetzten Parathionmengen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Standardabweichungen der pro-

zentualen Hemmwerte von Parathion und der Ergebnisse der Modellversuche zeigt, daß die Genauigkeit der Methode bereits durch einen einfachen Aufarbeitungsgang stärker beeinflusst wird als durch die im Verlaufe der enzymatischen Reaktion auftretenden Schwankungen.

7. Es wurde der Versuche unternommen, die Cholinesterasehemmung unter Anwendung des bei den quantitativen Versuchen zugrunde gelegten Prinzipes zur Lokalisierung von Insektiziden auf Papierchromatogrammen heranzuziehen. Eine Versuchsanordnung zur Durchführung der enzymatischen Reaktion auf Papierchromatogrammen wurde beschrieben. Es gelang auf diese Art, in Pflanzenextrakten vorhandene Wirkstoffe qualitativ nachzuweisen. Die Methode schließt die Verwendung zweiphasiger Trennsysteme aus, da das lipophil imprägnierte Papier nur in geringem Maße die Enzymlösung aufnimmt.

Literaturverzeichnis

- 1) Arbusow, A. ref. Chem. Zentralblatt 77,
1639 (1906)
- 2) Lange, W. Chem. Ber. 65, 1598 (1932)
 v. Krüger, G.
- 3) O'Brien, R.D. Toxic Phosphorus Esters, 3 - 8,
 Academic Press, New York - London,
 1960
- 4) Schrader, G. Die Entwicklung neuer Insektizide
 auf der Grundlage organischer Fluor-
 und Phosphorverbindungen, 1 - 26,
 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.,
 Monographien 62
- 5) Schrader, G. Angew. Chem. 62, 471 (1950)
- 6) Franz, J. Umschau 55, 209 (1955)
- 7) Krieg, A. Z. Pflanzenkrankh. 64, 321 (1957)
- 8) Niessen, H. Z. anal. Chem. 162, 94 (1963)
 Fehse, H.
- 9) Gunther, F.A. Analysis of Insecticides and Acari-
 Blinn, R.C. cides, 141, Interscience Publ.,
 New York - London, 1955
- 10) Biologische Bundesanstalt Braunschweig, Wartezeiten für
 die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln bei Nutzpflanzen,
 April 1961
- 11) Official FDA-Tolerances, NAC-News and Pesticide Reviews,
 Vol. 20, No 3 (1962)
- 12) Engst, R. Nahrung 6, 68 (1962)
- 13) Gage, J.C. in: Advances in Pest Control Research,
 Vol. IV, 183, Interscience Publ.,
 New York - London, 1961
- 14) Metcalf, R.L. J. Econ. Entomol. 42, 721 (1949)
 March, R.E.

- 15) Fukuto, T.R. in: Advances in Pest Control Research, Vol. I, 181, Interscience Publ. New York - London, 1957
- 16) Metcalf, R.L. Science 117, 527 (1953)
March, R.B.
- 17) Gage, J.C. Biochem. J. 54, 426 (1953)
- 18) Seume, F.W. J. Agric. Food Chem. 8, 36 (1960)
O'Brien, R.D.
- 19) Diggle, W.M. Biochem. J. 49, 491 (1951)
Gage, J.C.
- 20) Bowman, J.S. J. Agric. Food Chem. 5, 192 (1957)
Casida, J.E.
- 21) Mühlmann, H. Höfchen - Briefe 9, 116 (1956)
Tietz, H.
- 22) Flapp, F.W. J. Agric. Food Chem. 6, 652 (1958)
Casida, J.E.
- 23) Robbins, W.E. J. Agric. Food Chem. 5, 509 (1957)
- 24) Casida, J.E. J. Agric. Food Chem. 4, 772 (1956)
- 25) Cook, J.W. J. Agric. Food Chem. 5, 859 (1957)
- 26) O'Brien, R.D. J. Agric. Food Chem. 3, 56 (1955)
Spencer, E.Y.
- 27) Tsuyuki, H. J. Agric. Food Chem. 3, 922 (1955)
Stahman, M.A.
Casida, J.E.
- 28) Casida, J.E. J. Agric. Food Chem. 1, 883 (1953)
Stahman, M.A.
- 29) Spencer, E.Y. J. Agric. Food Chem. 5, 123 (1957)
O'Brien, R.D.
White, R.W.
- 30) Arthur, B.W. J. Agric. Food Chem. 5, 186 (1957)
Casida, J.E.

- 31) Barthel, W.J. J. Am. Chem. Soc. 77, 2424 (1955)
Alexander, B.
Giang, P.A.
Hall, S.A.
- 32) Sternberg, J. J. Agric. Food Chem. 2, 1125 (1954)
Kearns, J.
Moorefield, H.
- 33) Kolbezen, M.J. J. Agric. Food Chem. 2, 864 (1954)
Metcalf, R.L.
Fukuto, T.R.
- 34) Casida, J.E. Biochem. J. 60, 487 (1955)
- 35) O'Brien, R.D. Toxic Phosphorus Esters, 257
Academic Press, New York - London,
1960
- 36) Gunther, F.A. Analysis of Insecticides and Acari-
cides 226, Interscience Publ.,
New York - London, 1955
Blinn, R.C.
- 37) Schechter, M.S. in: Advances in Pest Control Research,
Hornstein, J. Vol. I, 363, Interscience Publ.,
New York - London, 1957
- 38) Kutschinsky, A.H. Anal. Chem. 24, 1188 (1952)
Luce, E.N.
- 39) Norton, L.B. Anal. Chem. 22, 1451 (1950)
Schmalzreidt, B.
- 40) Erwin, W.R. J. Agric. Food Chem. 3, 676 (1955)
Schiller, O.
Hoskins, W.M.
- 41) Odencrantz, J.F. Anal. Chem. 22, 1066 (1950)
Rieman, W.
- 42) Wain, R.L. Nature 159, 68 (1947)
Martin, A.E.
- 43) Clifford, P.A. J. Ass. Off. Agric. Chem. 30,
337 (1947)
- 44) Averell, P.R. Anal. Chem. 20, 753 (1948)
Norris, M.V.

- 45) Gunther, F.A. Analysis of Insecticides and Aca-
 Blinn, R.C. ricides, 260, Interscience Publ.,
 New York - London 1955
- 46) Niessen, H. Pflanzenschutznachrichten "Bayer"
 Tietz, H. 15, 129 (1961)
 Frehse, H.
- 47) Maier-Bode, H. Anz. Schädlingkunde 35, 49 (1962)
- 48) Frehse, H. J. Agric. Food Chem. 7 553 (1959)
 Tietz, H.
- 49) Agazzi, E.J. Anal. Chem. 25, 237 (1953)
 Peters, E.D.
 Brooks, F.R.
- 50) Beckmann, H.F. J. Agric. Food Chem. 6, 104 (1958)
 Ibert, E.R.
 Adams, B.B.
 Skovlin, D.O.
- 51) Phillips, W.F. J. Agric. Food Chem. 2, 1226
 De Benedictis, M.E. (1954)
- 52) Ligget, L.M. Anal. Chem. 26, 748 (1954)
- 53) Gunther, F.A. J. Agric. Food Chem. 7, 330 (1959)
 Blinn, R.C.
 Benjamini, E.
 Kinkade, W.R.
 Anderson, L.D.
- 54) Mc Caulley, D.F. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 43,
 Cook, J.W. 710 (1960)
- 55) Paulig, G. Dtsch. Lebensmittelrdsch. 56,
 223 (1960)
- 56) Paulig, G. ibidem 56, 296 (1960)
- 57) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 8, 403 (1960)
 Archer, T.E.
 Rubinstein, D.
- 58) Cook, J.W. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 37,
 684 (1954)

- 59) Mitchell, L.C. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 41,
781 (1958)
- 60) Mitchell, L.C. ibidem 43, 810, (1960)
- 61) Fischer, R. Arch. Toxikol. 19, 119 (1961)
Klingelhöfer, W.
- 62) Hanos, C.S. Nature 164, 1107 (1949)
Isherwood, F.A.
- 63) Müller, R. Mittlg. Geb. Lebensmittelunters.
Schock, W. und Hyg. 48, 152 (1957)
Ernst, G.
- 64) Eichenberger, J. Mittlg. Geb. Lebensmittelunters.
Gay, L. und Hyg. 51, 423 (1961)
- 65) Jucker, O. Mittlg. Geb. Lebensmittelunters.
und Hyg. 49, 299 (1958)
- 66) Weltzien, H.C. Naturwissenschaften 45, 288 (1958)
- 67) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 6, 910 (1958)
Archer, T.E.
- 68) Salo, T. ZUL 117, 369 (1962)
Salminen, K.
Fiskari, K.
- 69) Petrowitz, H.J. Chem. Ztg. 85, 867 (1961)
- 70) Kovacs jr., M.F. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 46,
884 (1963)
- 71) Coulson, D.M. J. Agric. Food Chem. 8, 399 (1960)
Cavanagh, L.A.
de Vries, J.E.
Walter, B.
- 72) Watts, J.V. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 45,
Klein, A.K. 102 (1962)
- 73) Coulson, D.M. J. Agric. Food Chem. 7, 250 (1959)
Cavanagh, L.A.
Stuart, J.

- 74) Mc Kinley, W.P. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 46,
43 (1963)
- 75) Dewey, J.E. J. Agric. Food Chem. 6, 274 (1958)
- 76) Frawley, P.F. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 35,
Laug, E.P. 741 (1952)
Fitzhugh, G.O.
- 77) Sun, Y.-P. in: Advances in Pest Control
Research, Vol. I, 467, Interscience
Publ. New York - London, 1957
- 78) Wasserburger, H.J. Pharmazie 7, 731 (1952)
Pharmazie 9, 838 (1954)
- 79) Pfaff, W. Z. f. Pflanzenkrankheit. und
Pflanzenschutz 62, 361 (1955)
- 80) Nolan, K. Agric. Chemiclas 5, 53 (1951)
Wilcoxon, F.
- 81) Pagan, C. Science 112, 222 (1950)
Hagemann, R.H.
- 82) Harwood, F. Science 131, 1369 (1960)
Areekul, S.
- 83) Hoskin, W.M. Anal. Chem. 24, 555 (1952)
Witt, J.M.
Erwin, W.R.
- 84) Keller, H. Naturwissenschaften 39, 249 (1954)
- 85) Ammon, R. Fermente, Hormone, Vitamine, Bd. II
Dirscherl, W. 711ff, G. Thieme, Stuttgart, 1960
- 86) Loewi, O. Pflüger's Arch. ges. Physiol.
Menschen, Tiere 189, 239 (1921)
203, 408 (1924)- 204, 361, 629
(1924)
- 87) Loewi, O. Pflüger's Arch. ges. Phys. Menschen,
Navratil, E. Tiere 214, 678 (1926); Klin. Woch.-
schrift. 5, 894 (1926)
- 88) Stedman, E. Biochem. J. 26, 2056 (1932)
Stedman, E.
Easson, L.H.

- 89) Ammon, R. Pflüger's Arch. ges. Physiol.
Menschen, Tiere 283, 486 (1933)
- 90) Nachmansohn, D. Science 100, 454 (1944)
Rothenburg, A.M.
- 91) Alles, G.A. J. Biol. Chem. 133, 375 (1940)
Hawes, R.C.
- 92) Mendel, B. Biochem. J. 37, 59 (1943)
Rudney, H.
- 93) Mendel, B. Nature 176, 783 (1955)
Meyers, D.K.
- 94) Augustinson, K.B. Science 111, 98 (1949)
Nachmansohn, D.
- 95) Nachmansohn, D. in: Methods in Enzymology, Vol. I,
Wilson, J.B. 644, Academic Press, New York -
London, 1955
- 96) Augustinson, K.B. in: Methods of Biochem. Analysis,
Vol. 5, 2ff, Interscience Publ.
New York - London, 1957
- 97) Wilson, J.B. in: The Enzymes, Vol. IV, 501ff,
Academic Press, New York - London,
1960
- 98) Wilson, J.B. J. Biol. Chem. 185, 479 (1950)
Bergmann, F.
- 99) Augustinson, K.B. Arzneimittelforschg. (Aulendorf)
4, 242 (1954)
- 100) Adrian, D.E. Nature 158, 625 (1946)
Feldberg, W.
Kilby, B.A.
- 101) Mackworth, J.F. Biochem. J. 42, 91 (1948)
Webb, E.C.
- 102) Gardiner, J.E. Biochem. J. 51, 78 (1952)
Kilby, B.A.
- 103) O'Brien, R.D. Toxic Phosphorus Esters, 73ff,
Acad. Press, New York - London,
1960

- 104) Wilson, I.B. Biochem. et biophys. acta N.Y. 18, 168 (1955)
- 105) Augustinsson, K.B. in: Methods of Biochem. Anal. Vol. 5, 14-63, Interscience Publ., 1957
- 106) Yip, G. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 43, 740 (1960)
Cook, J.W.
- 107) Stedman, E. Biochem. J. 27, 1055 (1933)
Stedman, E.
White, A.C.
- 108) Glick, D. Biochem. J. 31, 521 (1937)
- 109) Michel, H.O. J. Lab. Clin. Med. 34, 1564 (1949)
- 110) Giang, P.A. Anal. Chem. 23, 1830 (1951)
Hall, S.A.
- 111) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 6, 910 (1958)
Archer, T.E.
- 112) Hestrin, S. J. Biol. Chem. 180, 24 (1949)
- 113) Cook, J.W. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 37, 361 (1954)
- 114) Ravin, H.A. J. Biol. Chem. 191, 843 (1951)
Tsou, K.C.
Seligman, A.M.
- 115) Main, A.R. J. Biol. Chem. 78, 769 (1961)
Miles, K.C.
Seligman, A.M.
- 116) Casida, J.E. Biochem. J. 60, 487 (1955)
- 117) Barnett, R.J. Science 114, 579 (1951)
Seligman, A.M.
- 118) Kramer, D.N. J. Biol. Chem. 30, 251 (1958)
Gamson, R.N.
- 119) Archer, T.E. J. Agric. Food Chem. 7, 178 (1959)
Zweig, G.

- 120) Gomori, G. J. Lab. and Clin. Med. 42, 445 (1953)
- 121) van Asperen, K. J. Insect. Phys. 3, 306 (1959)
- 122) Beyer, H. Lehrbuch der organischen Chemie, 9. Aufl. 475, S. Hirzel, Leipzig, 1962
- 123) Gattermann, L. Die Praxis des organischen Chemikers, 38. Aufl. 264, W. de Gruyter
- 124) Gage, J.C. in: Advances in Pest Control Research, Vol. IV, 197, Interscience Publ. New York - London, 1961
- 125) Nesheim, E.D. J. Ass. Off. Agric. Chem. 42, 187 (1959)
Cook, J.W.
- 126) Goldstein, A. J. Gen. Physiol. 27, 529 (1944)
- 127) Boyd, G.R. J. Agric. Food Chem. 7, 615 (1959)
- 128) Fallscheer, H.O. J. Ass. Off. Agric. Chem. 39, 691 (1956)
Cook, J.W.
- 129) Yip, G. J. Ass. Off. Agric. Chem. 43, 740 (1960)
Cook, J.W.
- 130) Kaiser, H. Z. anal. Chemie 149, 47 (1956)
Specker, H.
- 131) Doerffel, K. Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen, 26-27, Springer-Verlag, 1962
- 132) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agric. Chem. 38, 150 (1955)
- 133) Thompson, R.R. J. Ass. Off. Agric. Chem. 44, 199 (1961)
Cook, J.W.
- 134) McKinley, W.P. J. Ass. Off. Agric. Chem. 45, 467 (1962)
Read, S.I.
- 135) Tauber, H. J. Am. Chem. Soc. 75, 326 (1953)

- 136) Ord, M.G.
Thompson, R.H.S. Biochem. J. 49, 191 (1951)
- 137) Niessen, H.
Tietz, H.
Frehse, H. Papierchromatographische Trennung
aromatischer Phosphorsäureinsek-
tizide, Veröffentlichung des Bio-
logischen Institutes der Farben-
fabriken Bayer AG, Leverkusen

A n h a n g

Abb. 17
Malathion

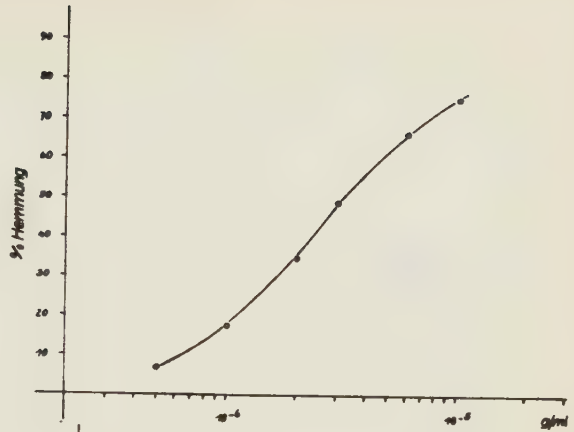


Abb. 18
Dipterex

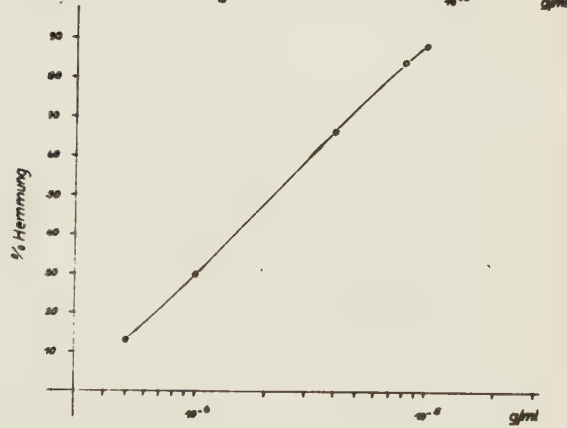


Abb. 19
Ethion

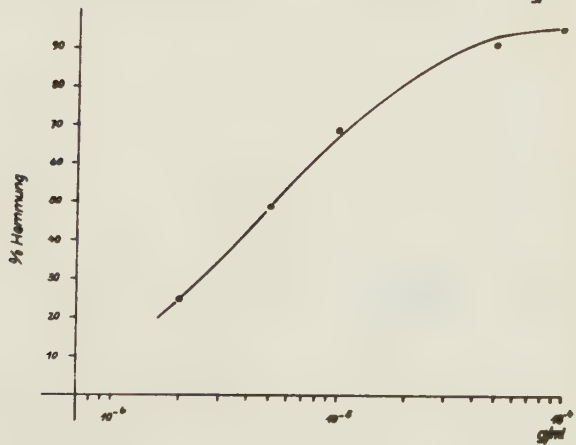


Abb. 20
Phosdrin

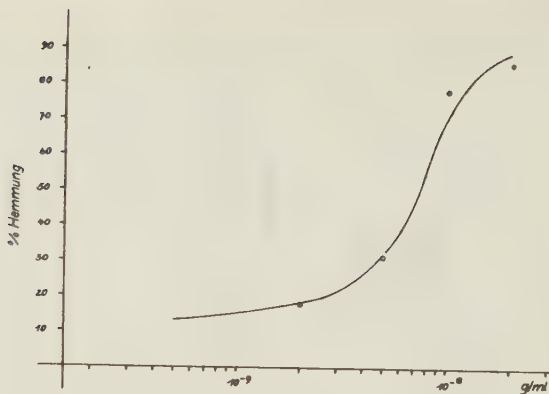


Abb. 21
Chlorthion

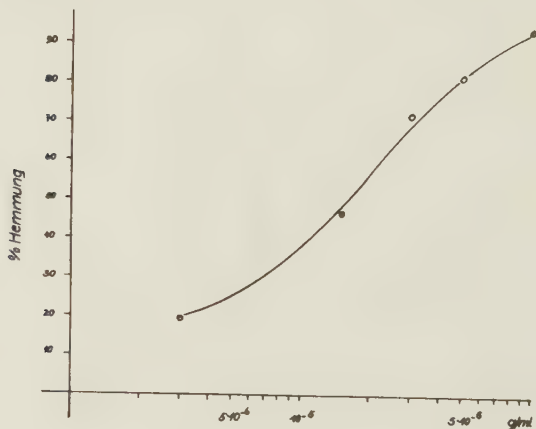


Abb. 22
Parathion

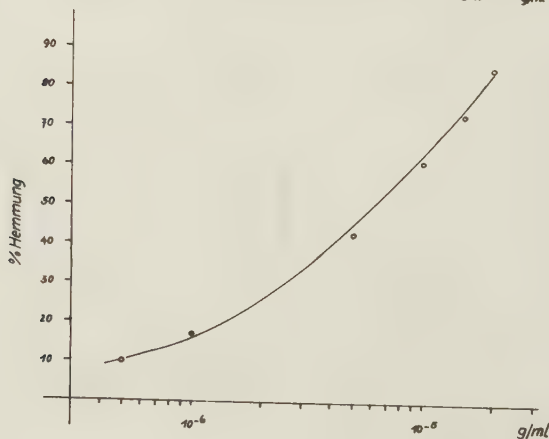


Abb. 23

Delnav

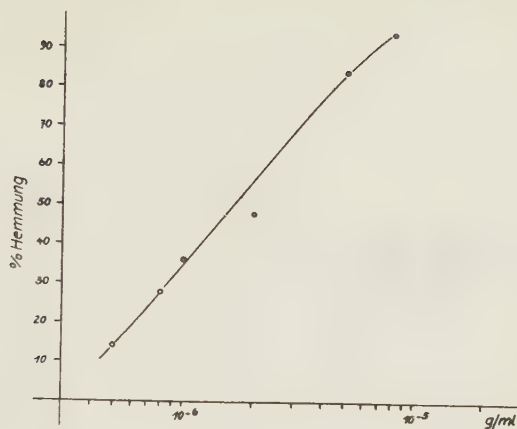


Abb. 24

Lebaycid

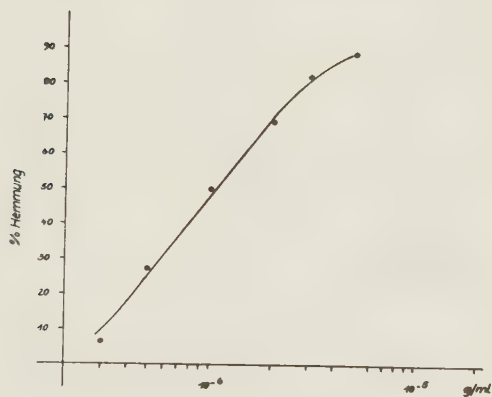


Abb. 25

Phosphamidon

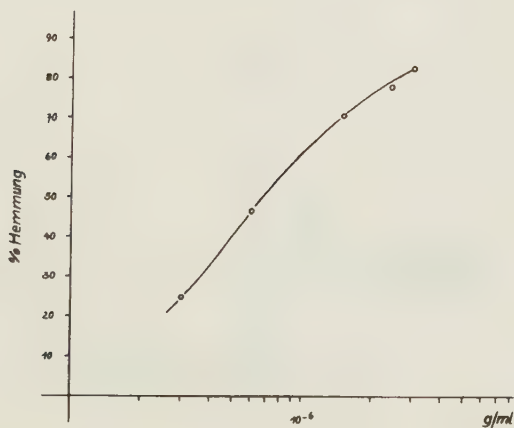


Abb. 26
Metasystox

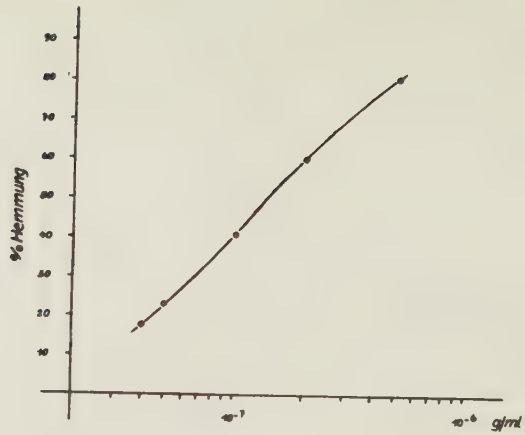


Abb. 27
Diazinon

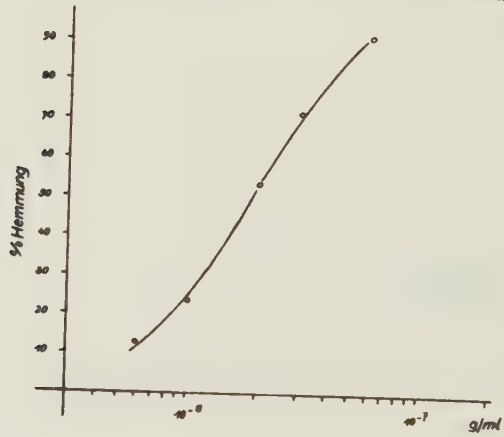


Abb. 28
Gusathion

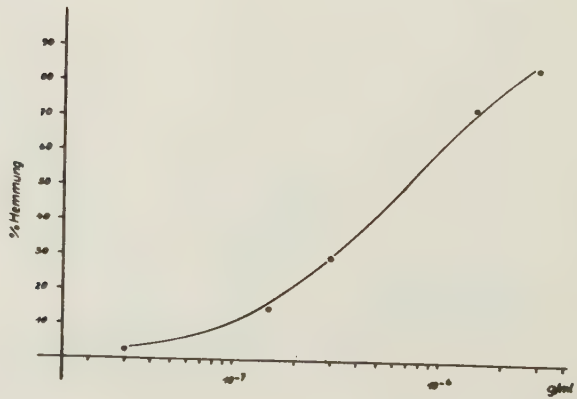


Abb. 29
Gusathion
(oxydiert)

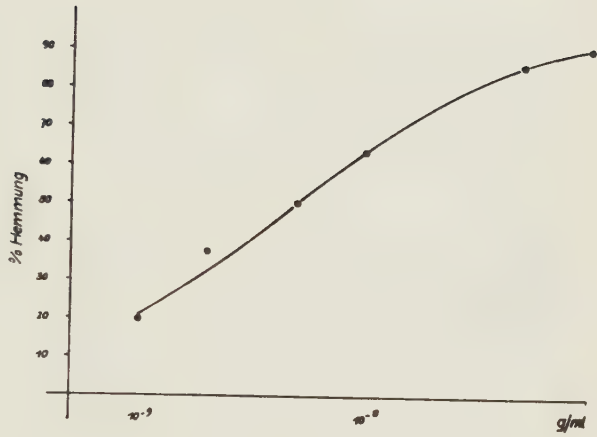


Abb. 30
Malathion
(oxydiert)

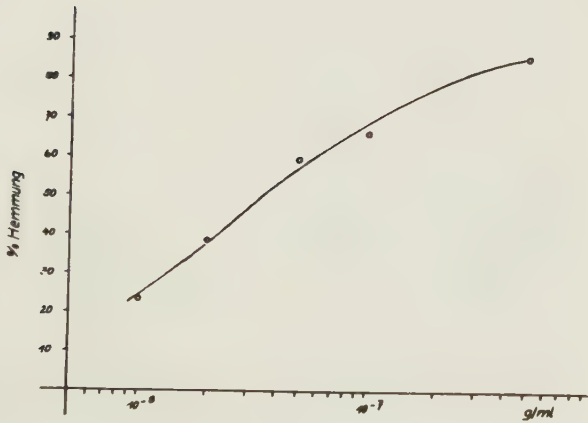


Abb. 31

Metasystox
(oxydiert)

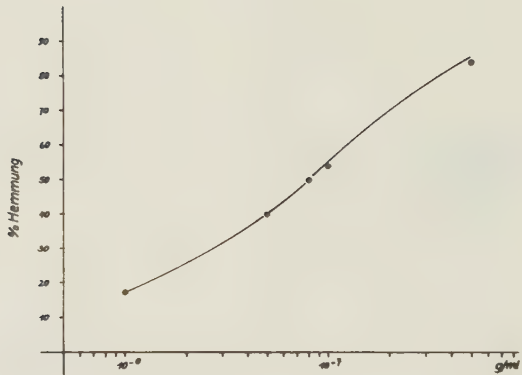


Abb. 32

Lebaycid
(oxydiert)

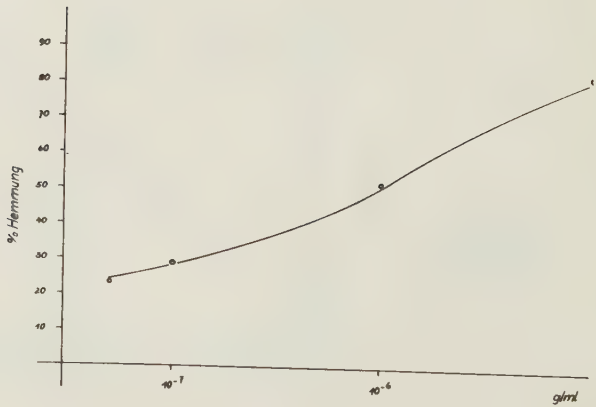


Abb. 33
Chlorthion
(oxydiert)

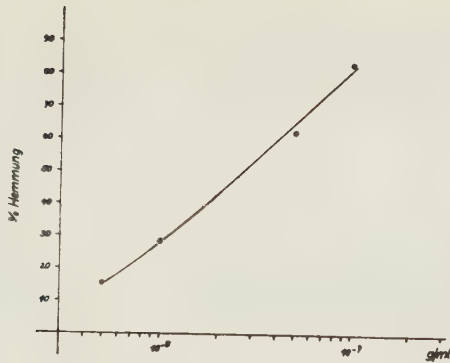


Abb. 34
Diazinon
(oxydiert)

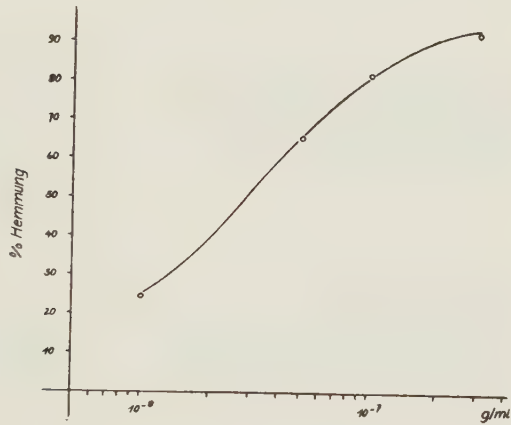
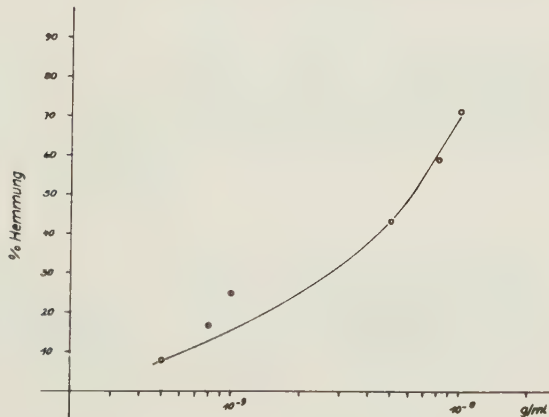
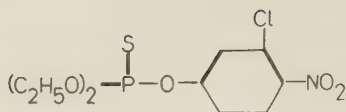


Abb. 35
Parathion
(oxydiert)



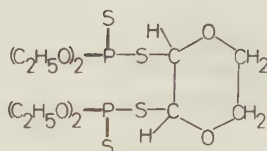
Chlorthion

O,O-Diaethyl-O-(4-nitro-3-chlorophenyl)-thiophosphat



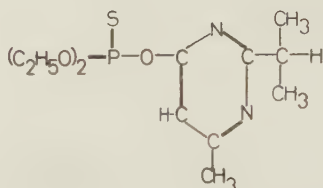
Delnav

O,O-Diaethyl-S,S-p-dioxanyl-(2,3)-bis-dithiophosphat



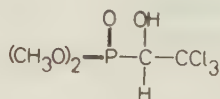
Diazinon

O,O-Diaethyl-O-(2-isopropyl-4-methyl-pyrimidyl-6)-thiophosphat



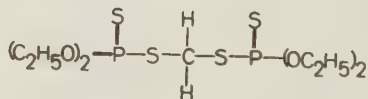
Dipterex

O,O-Dimethyl-O-1-hydroxy-2,2,2-trichloroethylphosphonat



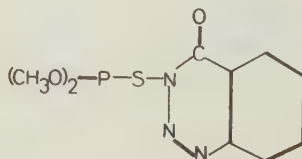
Ethion

O,O,O',O'-Tetraethyl-S,S'-methylen-bis-dithiophosphat



Gusathion

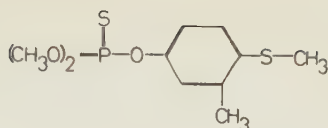
O,O-Dimethyl-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-dithiophosphat



Lebaycid

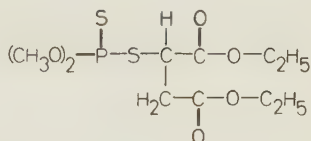
(Mercaptophos)

O,O-Dimethyl-O-(4-methylthio,
3-methyl)-phenylthiophosphat



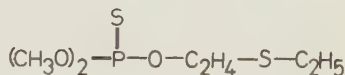
Malathion

O,O-Dimethyl-S-1,2-bis-
(aethoxycarbonylaethyl)-
dithiophosphat



Metasystox

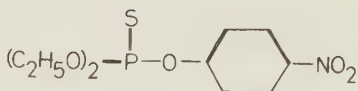
O,O-Dimethyl-O-2-(aethylthio)
-aethyl-thiophosphat



Parathion

(E 605)

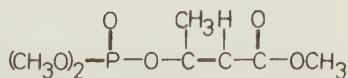
O,O-Diaethyl-O-p-nitrophenyl-
thiophosphat



Phosdrin

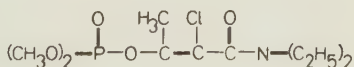
(PD 5)

O,O-Dimethyl-O-(1-methyl-2-
methoxycarbonyl)-vinylphosphat



Phosphamidon

O,O-Dimethyl-O-(1-methyl-2-
chlor-2-diaethylcarbamoyl
vinylphosphat



L e b é n s l a u f

Am 10. Mai 1934 wurde ich, Wilhelm Koch, als Sohn des verstorbenen Laboranten Martin Koch und seiner Ehefrau Maria, geb. Hell, in Oestrich im Rheingau geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Oestrich, danach das Realgymnasium in Geisenheim im Rheingau, wo ich im Frühjahr 1954 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem zweisemestrigen Medizinstudium entschloß ich mich, Pharmazie zu studieren. Von 1955 an arbeitete ich als Apothekerpraktikant in der Germania-Apotheke in Rüdesheim am Rhein, die ich nach der pharmazeutischen Vorprüfung im Frühjahr 1957 verließ, um ab Sommersemester des gleichen Jahres an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Pharmazie zu studieren. Im Anschluß an die pharmazeutische Prüfung im April 1960 arbeitete ich sechs Monate als Kandidat der Pharmazie in der Sonnen-Apotheke in Geisenheim im Rheingau.

Im November 1960 begann ich meine Tätigkeit als Praktikant im Lebensmittel-Untersuchungsamt der Stadt Frankfurt am Main, wo ich im Dezember 1961 die Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker ablegte. Seit 1962 beschäftige ich mich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Diemair mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit.

